

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

Časné změny exprese tkáňového endoglinu a VCAM-1 v aortě
myší po podávání vysokotukové diety

Early changes in tissue endoglin and VCAM-1 expression in
mice aorta after administration of high fat diet

diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:
Hradec Králové

Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, PhD
Bc. Iva Swierczková

2017

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Datum:

Podpis:

Poděkování

Poděkování patří především doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D za veškeré cenné rady, připomínky a věnovaný čas. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Kateřině Blažíčkové, Ph.D za vstřícný přístup a rady při zpracování praktické části práce.

V neposlední řadě děkuji také mé rodině a přátelům za podporu a trpělivost.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Školitel: doc. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Kandidát: Bc. Iva Swierczková

Název diplomové práce: Časné změny exprese tkáňového endoglinu a VCAM-1 v aortě myši po podávání vysokotukové diety.

Cíl práce: Cílem práce bylo sledovat změny exprese endoglinu a VCAM-1 v aortě myši po podání standardní a vysokotukové diety pomocí imunohistochemických metod. Následně byly porovnány výsledky kontrolní a experimentální skupiny.

Metoda: K experimentu byly použity dvouměsíční samice myši kmene C57BL/6J. První polovina myši byla krmena standardní dietou. Druhá skupina byla krmena dietou s obsahem 1,25 % cholesterolu a 40 % tuku. Myši byly krmeny po dobu následujících 3 měsíců. Imunohistochemická detekce byla realizována pomocí nepřímé trojstupňové metody avidin-biotin komplexu.

Výsledky: Exprese endoglinu byla pozorovatelná na cévním endotelu u obou skupin myši bez patrných rozdílů mezi experimentální a kontrolní skupinou. Také u VCAM-1 jsme pozorovali expresi na cévním endotelu. U kontrolní skupiny se exprese jevila silnější než u skupiny experimentální, nicméně tyto rozdíly nebyly zásadní.

Závěr: Podávání vysokotukové diety s obsahem 1,25 % cholesterolu a 40 % tuku po dobu 3 měsíců nemělo vliv na expresi endoglinu a VCAM-1 v aortě myši. Použitý

model myší, krmený touto dietou v tomto určitém časovém úseku nemá signifikantní vliv na rozvoj dysfunkce endotelu z pohledu morfolického nálezu.

Klíčová slova: VCAM-1, endoglin, endotel, imunohistochemie

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Consultant: doc. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Candidate: Bc. Iva Swierczková

Title of Thesis: Early changes in tissue endoglin and VCAM-1 expression in mice aorta after administration of high fat diet

Background: The aim of the thesis was to observe changes in tissue endoglin and VCAM-1 expression in mice aorta after administration of chow and high-fat diet using immunohistochemical methods. Finally, these two groups were compared.

Method: Two-month-old female C57BL/6J mice were used for the experiment. First half, which served as a control group, was fed with the chow diet. The second half was fed with the high fat diet, which contains 1.25 % of cholesterol and 40 % of fat, for the period of 3 months. Immunohistochemical analysis was performed using the indirect three-step avidin-biotin complex method.

Results: The expression of endoglin was detected on the vascular endothelium but there were no evident differences in the staining intensity between the control group and the experimental group. We also observed VCAM-1 expression in the vascular endothelium. In the control group, expression appeared to be stronger than the experimental group, however these differences were not that significant.

Conclusions: Administration of high fat diet with 1,25 % of cholesterol and 40 % of fat for 3 months had no effect on the expression of endoglin and VCAM-1 in mice aorta.

The mouse model fed by this diet at this particular time has no significant effect on the development of endothelial dysfunction from a morphological point of view.

Keywords: endoglin, VCAM-1, endothelium, immunohistochemistry

Obsah

ÚVOD.....	10
I. TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1 Histologie cév.....	11
1.1 Obecná struktura cév.....	11
1.2 Specifická struktura cév.....	13
1.2.1 Arterie.....	13
1.2.2 Vény.....	14
1.2.3 Kapiláry.....	15
2 Endotel a jeho funkce.....	17
3 Endotelová dysfunkce.....	19
4 Adhezní molekuly.....	21
4.1 Vaskulární adhezní molekula-1 (VCAM-1).....	22
4.2 Funkce VCAM-1 a regulace její exprese ve vztahu k endotelu.....	23
5 Endoglin.....	24
5.1 Funkce endoglinu.....	24
6 Myší modely aterosklerózy.....	26
6.1 Apolipoprotein E deficitní myši.....	27
6.2 LDL receptor deficitní myši.....	28
6.3 ApoE/LDL receptor-deficientní myši (ApoE ^{-/-} /LDLr ^{-/-}).....	28
7 Imunohistochemické metody.....	29
7.1 Přímá a nepřímá imunohistochemie.....	29
7.2 ImmPress TM a EnVision [®] metodika.....	31
7.3 Avidin-Biotin Complex metodika.....	32
II. PRAKTICKÁ ČÁST.....	34
8 Cíl práce, zadání práce.....	34
9 Zvířata.....	35

10	Imunohistochemie	36
III.	VÝSLEDKY	39
IV.	DISKUZE.....	52
	ZÁVĚR.....	54
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ	55
	SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ.....	57
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	59

ÚVOD

Ateroskleróza je manifestující onemocnění cévní stěny, které po mnoha letech může vést ke komplikacím, jako jsou ischemická choroba srdeční, cévní mozková příhoda či ischemická choroba dolních končetin. Jednoznačná příčina vzniku aterosklerózy není stále objasněna, avšak vzniká na podkladě poškození a dysfunkce cévního endotelu.

Endotel hraje důležitou roli v udržení cévní homeostázy za pomoci exprese mnoha látek. Za fyziologických podmínek udržuje rovnováhu mezi vazodilatací a vazokonstrikcí nebo trombogenezí a fibrinolýzou aj. Na endotel působí mnoho faktorů, které mohou ovlivnit jeho fyziologické funkce, to může vést k funkčnímu poškození tohoto orgánu a následně k endotelové dysfunkci.

Stav poškození endotelu je možné sledovat pomocí laboratorního stanovení markerů, které cévní endotel exprimuje. Pro tuto diplomovou práci byl zvolen endoglin a VCAM-1. Tyto markery byly stanovovány imunohistochemicky nepřímou trojstupňovou metodou avidin-biotin komplex.

Expresi endoglinu byla prokázána v cévách postižených aterosklerózou, především v endotelových buňkách a buňkách hladké svaloviny. Dá se tedy předpokládat účast endoglinu na aterogenezi. L-endoglin má angiogenní účinky, S-endoglin má účinky antiangiogenní. S-endoglin přispívá ke kardiovaskulárním onemocněním.

VCAM-1 je endotelová adhezní molekula, která hraje dominantní roli v iniciaci aterosklerózy. VCAM-1 není běžně za fyziologických podmínek exprimována, ale v případě působení zánětlivých cytokinů na endotel dochází k expresi VCAM-1.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 Histologie cév

Veškeré cévy v těle se vyznačují podobnou stavbou zahrnující 3 vrstvy. Tunica intima, tunica media a tunica adventitia (viz. obr. 1). Cévy jsou rozdílné v zastoupení těchto vrstev, v průsvitu a šířce stěny [1, 2].

1.1 Obecná struktura cév

Tunica intima

Tunica intima je situována do vnitřního průsvitu cév a tvořená endotelem, který nasedá na bazální laminu a subendotelovou vrstvu. Endotel tvořený endotelovými buňkami v podélném směru vystýlá cévní stěnu. Subendotelová vrstva sestává z řídkého kolagenního vaziva s ojedinělými buňkami hladké svaloviny.

Mezi tunica intima a tunica media se navíc u arterií nachází hraniční vrstva nazývaná membrána elastica interna.

Tunica media

Je střední vrstva tvořená z velké části hladkou svalovinou, umožňující pohyb stěny cévy. Hladká svalovina má různý počet vrstev, jejíž kruhově uspořádané buňky vytváří šroubovici. Zároveň hladká svalovina obsahuje mezibuněčnou hmotu z elastických a retikulárních vláken, která mají schopnost samy tvořit hladké svalové buňky.

U arterií elastického typu se vlákna spojují v elastické blanky, ke kterým se upínají hladké svalové buňky. Blanky jsou opatřeny otvory, ty slouží k nepropustnosti elastinu.

Arterie navíc disponují membrána elastica externa – hraniční vrstva mezi tunica media a tunica adventitia.

Tunica adventitia

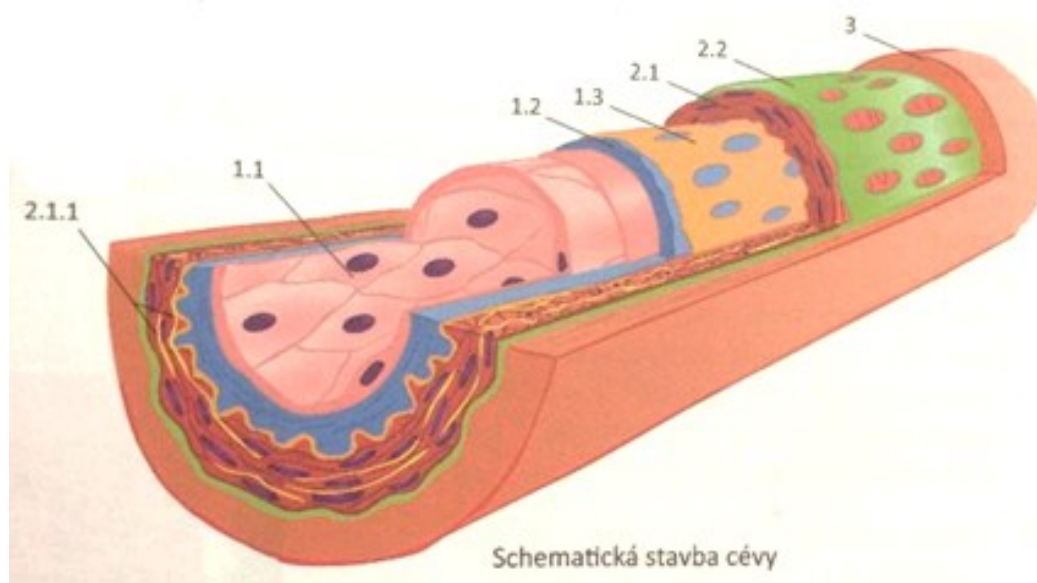
Tunica adventitia obsahuje řídké kolagenní vazivo s podélným průběhem kolagenních a elastických vláken. Dále obsahuje fibroblasty a adipocyty. Ojediněle

mohou být pozorovány tukové buňky, drobné mízní kapiláry a u vén hladké svalové buňky.

U větších cév s průměrem nad 1 mm, které nestačí vyživovat pouze difuzí živin přímo z průsvitu, jsou přítomny cévy menší vasa vasorum (cévy cév), ty pomáhají cévy vyživovat. Toto zásobení živinami pokrývá adventicii a vnější část tunica media. Častěji se vyskytuje u vén z důvodu nižší koncentrace kyslíku.

Probíhají zde také nervi vasorum (nervy cév). Tyto větve autonomních nervů, které pronikají až do tunica media, regulují napětí cévní stěny stahem hladkých svalových buněk [1, 3, 4, 7].

Obrázek 1 Schématické znázornění stavby cévy. 1.1 endotel, 1.2 subendotelová vrstva, 1.3 membrana elastica interna, 2.1 hladká svalovina, 2.1.1 membranae fenestrae elasticae, 2.2 membrana elastica externa, 3 tunica adventitia [1].



1.2 Specifická struktura cév

U krevních cév rozlišujeme arterie, vény a kapiláry.

1.2.1 Arterie

Vedou krev od srdce směrem ke tkáním. Podle průměru a stavby rozlišujeme arterioly, arterie malého a středního typu (arterie svalového typu) a arterie velkého typu (arterie elastického typu), (viz. obr. 2).

Arterioly (průměr menší než 0,5 mm)

V tunica intima se nachází vrstva endotelových buněk a subendotelová vrstva. Endotelové buňky (mimo kapiláry) obsahují tyčinkovitá granula (Weibel-Paladeho granula), ty obsahují protein nezbytný pro koagulaci krve (Von-Willebrandův faktor). Membrana elastica interna je přítomná jen u větších arteriol.

Tunica media obsahuje jednu až pět vrstev hladkých svalových buněk. Membrana elastica interna není zastoupená.

Tunica adventitia je velmi tenká.

Arterie svalového typu (malé a střední velikosti)

Tunica intima je opět tvořena endotelovými buňkami a tlustší subendotelovou vrstvou. Mohou se vyskytovat i jednotlivé buňky hladké svaloviny. Dobře vyvinutá je zde membrana elastica interna.

Až 40 vrstev hladkých svalových buněk obsahuje tunica media, a to v závislosti na průměru cévy, které ve svazcích tvoří šroubovici. Také zde nacházíme větší množství elastických vláken tvořících lamely. Membrana elastica externa je vyvinutá u větších arterií svalového typu.

Tunica adventitia tvoří longitudinálně uspořádané kolagenní a elastická vlákna. Vyskytují se zde fibroblasty a adipocyty.

Arterie elastického typu (velké arterie)

Příkladem velké arterie je například aorta a její velké větve. Obsahují velké množství elastinu, to způsobuje nažloutlé zbarvení na průřezu.

Tunica intima je silnější než v arteriích svalového typu. Má podobné endotelové buňky a tlustou subendotelovou vrstvu.

V tunica media je membrána elastica interna neodlišitelná od ostatních elastických blanek a společně tvoří membranae fenestrae. Ty jsou ve stěně cévy uspořádány koncentricky. Membrana elastica externa není vyvinutá.

Tenká tunica adventitia obsahuje především podélně uspořádaná elastická a kolagenní vlákna [1, 3, 4].

1.2.2 Vény

Opět jako u arterií dělíme vény na venuly, vény malé, střední a velké. Při stejném průměru mají arterie oproti vénám vždy stěnu silnější. U vén je nejsilnější stěnou tunica adventitia, kdežto u arterií tunica media (viz. obr. 2).

Venuly (s průměrem 0,2 – 1 mm)

Tunica intima je tvořena endotelem s jen nepatrným množstvím subendotelového vaziva.

Tunica media je tenká a složena z vrstev hladkých svalových buněk, občas nemusí být hladké svalové buňky zastoupeny vůbec.

Tunica adventitia je složena z kolagenního vaziva a podélně uspořádaných kolagenních vláken. Tunica adventitia je nejtlustší vrstvou stěny venul.

Malé a střední vény (průměr 1 - 9 mm)

Tunica intima tvoří především endotel s malou vrstvičkou subendotelu. Tunica media je složena ze svazečků hladkých svalových buněk více než z celých vrstev svalové tkáně. Vyskytují se zde retikulární vlákna a síť vláken elastických.

Dobře vyvinutá je tunica adventitia s longitudinálně postavenými kolagenními vlákny. Je možné pozorovat i podélně uspořádané svalové buňky.

Velké vény

Struktura stěny může být rozdílná v závislosti na umístění cévy.

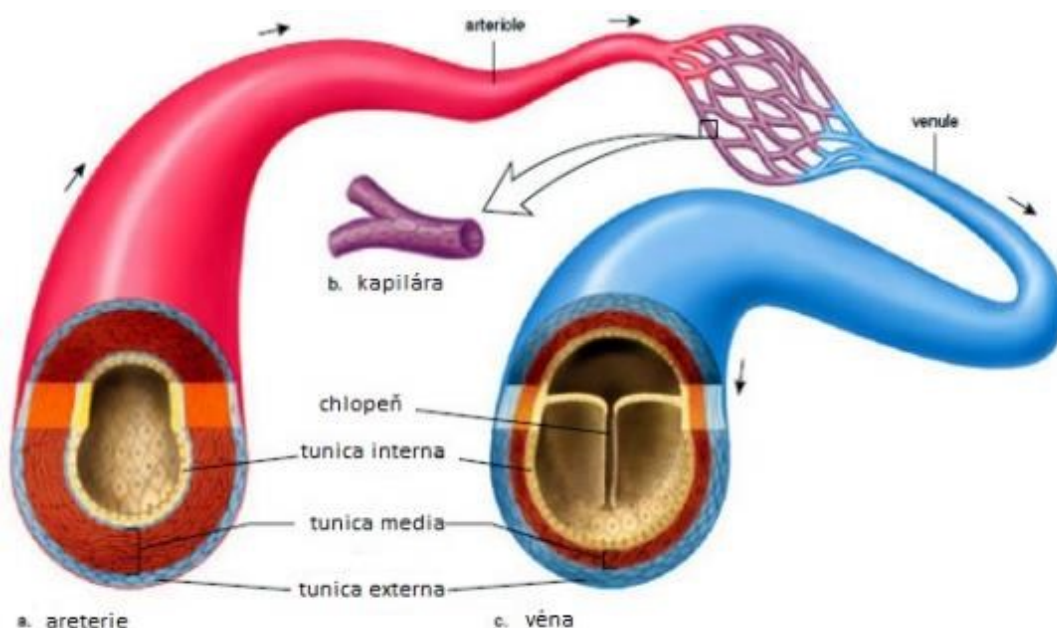
Tunica intima bývá dobře vyvinutá, tvořená endotelem a tlustší subendotelovou vrstvou. Zřídka se zde nacházejí longitudinálně uspořádané hladké svalové buňky.

Tunica media je díky nízkému počtu vrstviček hladkých svalových buněk velmi tenká. Vyskytují se zde elementy vazivové tkáně.

Tunica adventitia je u velkých vén nejsilnější. Velké vény pod úrovní srdce obsahují svazky longitudinálně uspořádaných hladkých svalových buněk. Ty zpevňují stěny vén a zabraňují její distenzi.

U malých a středních vén jsou vyvinuty chlopně, které usměrňují tok krve směrem do srdce. Chlopně představují dvě kapsovitě výchlípky tunica intima [1, 4].

Obrázek 2 Graficky znázorněný rozdíl mezi jednotlivými vrstvami arterií a vén [8].



1.2.3 Kapiláry

Stěna kapiláry je tvořena jednou vrstvou endotelových buněk, které se stáčí a tvoří tak cylindrický prostor. Průměr kapilár je v rozmezí 7 – 9 μm . Kolem kapilár bývá vyvinuta vrstvička longitudinálně řazených kolagenních vláken, ty představují ekvivalent k adventiciím větších cév. Kapiláry dělíme do čtyř skupin dle struktury endotelové výstelky a bazální membrány.

Kapiláry se souvislou endotelovou výstelkou (somatického typu)

Mají souvislou bazální membránu mezi endotelovými buňkami. Na bazální membránu nasedají pericyty a jemné kolagenní a retikulární fibrily. Pericyty mají dlouhé cytoplazmatické výběžky tvořící vlastní bazální membránu, zároveň mohou být schopny kontrakce. Prochází zde řada látek i menší molekuly bílkovin. Vyskytují se především v mozku, srdci, svazech a kůži.

Kapiláry fenestrované (viscerálního typu)

Endotelová výstelka má ve svých výběžcích fenestrace, které jsou přepažené bazální membránou (diafragmou). Vyskytují se v oblasti s výraznou resorpcí nebo filtrací (např. glomerulus, střevní sliznice).

Kapiláry s póry

Endotelové buňky obsahují póry. Póry jsou pravé, nepřekryté otvory s velikostí 60 - 100 nm. Bazální lamina je souvislá. Tyto kapiláry jsou pouze v glomerulech ledviny.

Kapiláry sinusoidní

Kapiláry s nepravidelným lumen. Ve výběžcích endotelových buněk se nacházejí četné póry i fenestrace. Bazální lamina sinusoid není kontinuální. Tyto sinusoidní kapiláry jsou běžné v játrech nebo kostní dřeni [1, 4, 5, 9, 45].

2 Endotel a jeho funkce

Endotel tvoří jednovrstevnou výstelku lumen cév. Endotelová buňka je plochá, mnohoúhelná s vyklenutým jádrem v centrální oblasti (viz obr. 3). Buňka s délkou 25 - 50 μm je protažená ve směru toku krve [1, 6].

Obrázek 3 Endotelová buňka [47].



Každá endotelová buňka se může částečně kontrahovat díky čteným mikrofilamentům. Endotelové buňky spolu s bazální laminou tvoří nesmáčivý povrch, kterým protéká krev.

Výzkum posledních let ovšem ukazuje, že je endotel metabolicky velmi aktivní orgán a oplývá řadou fyziologických funkcí. Kromě role v metabolismu cévní stěny, koagulaci a transportních procesech má velký vliv na kontrakci hladké svaloviny tunica media.

Mezi základní funkce endotelu patří řízená propustnost mezi okolními tkáněmi a krví. Kontrolován je prostup jak pro buněčné elementy, tak pro nebuněčné komponenty. Pro nebuněčné komponenty je využívána cesta transportních mechanismů, paracelulárních i transcelulárních. Leukocyty procházejí za pomoci buněčných adhezních molekul. Těchto molekul endotel exprimuje celou řadu (E-selektin, ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1) [6].

Endotel produkuje látky s vazokonstrikčním a vazodilatačním účinkem, které jsou důležité k optimálnímu proudění krve cévou.

Látky s vazodilatačním účinkem

- Oxid dusnatý (NO) je plyn kontinuálně syntetizovaný aminokyselinou L-argininem endotelovou syntázou oxidu dusnatého (eNOS). Tato látka se podílí

na řadě biologických procesů. NO udržuje cévní homeostázu, reguluje buněčný růst, má vazodilatační a protizánětlivý účinek. Hraje důležitou roli při inhibici apoptózy endotelových buněk, pomáhá inhibovat expresi adhezních molekul a tlumí adhezi a agregaci trombocytů. Se zvyšujícím se množstvím působících rizikových faktorů (hypertenze, hypercholesterolemie, kouření, diabetes mellitus a srdeční selhání) dochází ke snížení uvolňování NO do arteriální stěny. Tím dochází k poruše rovnováhy v endotelu [6, 2, 10, 35].

- Prostacyklin (PGI₂) a jeho syntézu ovlivňuje enzym cyklooxygenáza z kyseliny arachidonové. Ten reguluje schopnost endotelových buněk produkovat PGI₂. PGI₂ mimo vazodilataci inhibuje proliferaci hladkých svalových buněk a agregaci destiček. K uvolňování dochází za stejných situací jako u NO a zároveň se navzájem zesilují jejich účinky [6, 11, 12].

Látky s vazokonstrikčním účinkem

- Endotelin-1 (ET-1) patří do skupiny látek produkováných endotelem. Jeho funkcí je schopnost kontrahovat buňky hladké svaloviny pomocí receptorů a je účinný vazopresor. ET-1 má pozitivní inotropní účinek na myokard. Hraje roli u sekrece natriuretického peptidu. Zvýšené hladiny se mohou vyskytovat u městnavého srdečního selhání [13].
- Tromboxan 2 (TXA₂) je další látkou s vazokonstrikčním účinkem, který vzniká působením enzymu cyklooxygenázy [2].

Další funkcí endotelu je kontrola fibrinolýzy. Enzymem štěpícím fibrin je plasmin, který vzniká z cirkulujícího plasminogenu, působením tkáňového aktivátoru plasminogenu (t-PA). Na t-PA pak inhibičně působí plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). Obě látky jsou endotelem syntetizovány a uvolňovány dle potřeby.

Endotel hraje roli také v angiogenezi. Reparativní pochody kontrolují látky jako například transformující růstový faktor beta (TGF-β), fibroblastový růstový faktor, destičkový růstový faktor, interleukin-1 (IL-1) a endotelin-1 (ET-1). Jmenované látky stimulují růst buněk hladké svaloviny a pozitivně ovlivňují jejich migraci

do subendotelového prostoru. Nezbytný je také NO, který brání proliferaci hladkých svalových buněk, a tím nedovoluje hypertrofii cévní stěny [6].

3 Endotelová dysfunkce

Jedná se o funkční poškození endotelu, které je charakterizováno zejména zvýšenou propustností cévní stěny, nerovnováhou mezi vazoaktivními, hemokoagulačními a stimulujícími působky. Dalším projevem bývá nedostatečná vazomotorická odpověď na endotel-dependentní podnět, zvýšené riziko trombóz a nedostatečná inhibice subendotelové proliferace. Endotelová dysfunkce je morfologicky němou, časnou fází aterosklerózy. Zároveň však hraje roli u klinické manifestace aterosklerózy a jejích morfologických lézí. Důležitá je také u patogeneze hypertenze, srdečního a renálního selhání, sepse a dalších [6].

Rizikové faktory endotelové dysfunkce

- Kouření
- Oxidační stres, hypoxie
- Obezita
- Diabetes, hyperglykémie
- Zánět, infekce, cytokiny
- Hypertenze
- Abnormální hemodynamické síly (změny/stagnace toku krve)
- Znečištění životního prostředí (částice pod 10 µm)

Tyto faktory mohou působit samostatně, častěji ovšem působí více faktorů současně, ty pak společně zvyšují šanci vzniku endotelové dysfunkce.

Endotelová dysfunkce hraje roli jak u časných, tak i u pozdních fází aterosklerózy. Dysfunkční endotel dává možnost průniku aterogenním lipidům. Expresí adhezivních molekul a produkcí cytokinů je usnadněno nahromadění monocytů v cévní stěně. Ty se následně mění v makrofágy a pěnové buňky. Snížením produkce NO je dána přednost řadě růstovým faktorům, které stimulují hladké svalové buňky k migraci do subendotelu a k produkci vazivové komponenty aterosklerotických lézí.

Bylo experimentálně prokázáno, že endotelová dysfunkce může urychlit či dokonce sama způsobit aterosklerotické změny (přinejmenším u středních arteriál). Nedostatečná produkce NO, prostacyklinu a dalších působků, které inhibují adhezi a agregaci trombocytů spolu se zvýšenou expresí von-Willebrandovým a tkáňovým faktorem vytváří protrombogenní stav. To může způsobit rychlé uzavření arterie i při menší ruptuře hemodynamicky nevýznamného plátu s nasedající trombózou. Častěji k tomuto dochází, když endotelovou dysfunkci provází snížená fibrinolýza. Zvýšený sklon k vazospazmům pak může arterii uzavřít úplně.

Důležitá u endotelové dysfunkce je vratnost. Při odbourání faktorů, které dysfunkci vyvolaly, může být funkce endotelu obnovena. [6, 14].

4 Adhezní molekuly

Při tvorbě aterosklerotických lézí jsou aktivovány cévní endotelové buňky. V tomto procesu dochází k expresi leukocytových adhezních molekul a chemokinů [15].

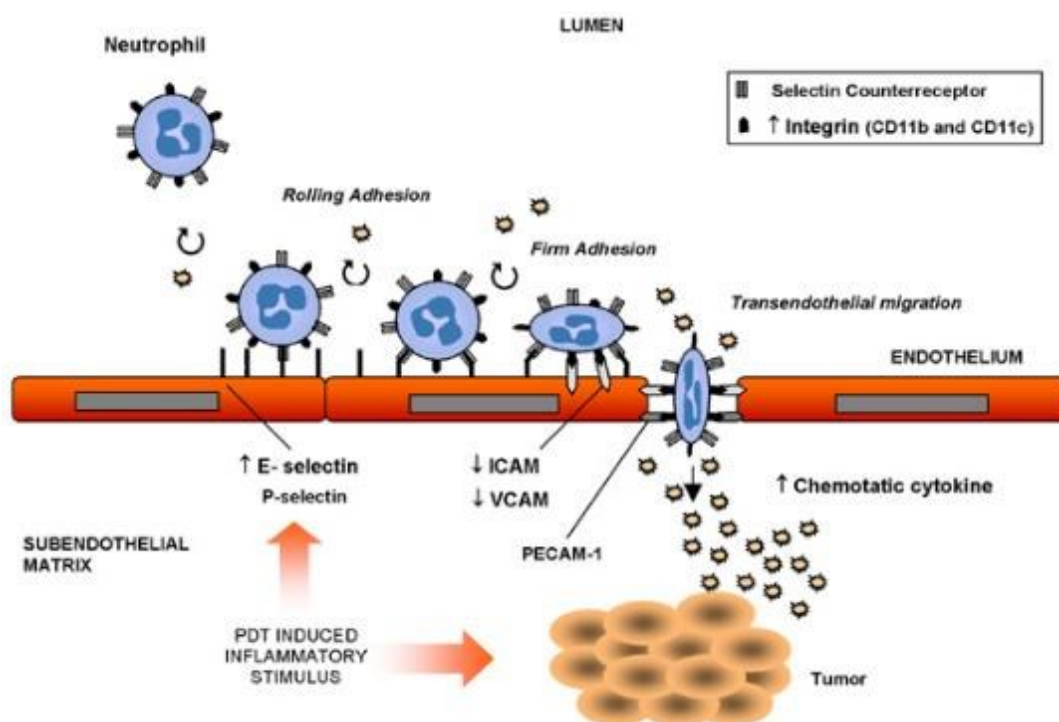
Za adhezní molekuly jsou označovány glykoproteiny, které zajišťují interakci mezi buňkami nebo mezi buňkou a mimobuněčnou hmotou. Jsou nezbytné ve všech fázích imunitního procesu, jako je migrace buněk do místa zánětu, prezentace a rozpoznání antigenů či tvorba protilátek.

Podle struktury jsou adhezní molekuly řazeny do různých skupin: Imunoglobulinová skupina, kadheriny, selektiny, integriny a jiné adhezní molekuly [16].

Cirkulující leukocyty se nejprve kutálejí po endotelu, následně pomocí selektinu a integrinu mohou k endotelu přilnout a dochází k upevnění vazby pomocí intracelulární adhezní molekuly-1 (ICAM-1) a vaskulární adhezní molekuly-1 (VCAM-1). Poté následuje transendoteliální vstup a chemotaxe k místu zánětu (viz obr. 4) [17].

V této práci se zabýváme imunoglobulinovou skupinou, konkrétně vaskulární adhezní molekulou-1 (VCAM-1).

Obrázek 4 Prostup leukocytů skrz endotel za pomoci adhezních molekul [18].



4.1 Vaskulární adhezní molekula-1 (VCAM-1)

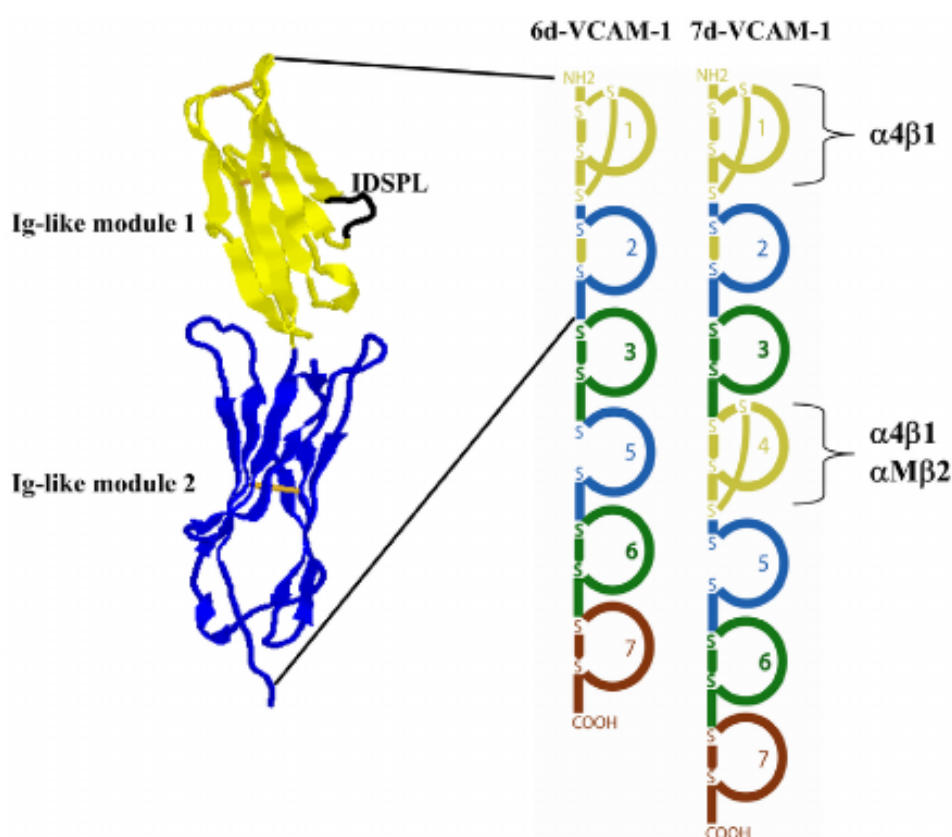
VCAM-1 je endotelová adhezní molekula, která spadá do imunoglobulinové skupiny. Tato molekula se může účastnit aterogeneze za pomoci akumulace monocytů v intimě arterie a jejich následné transformace v makrofágy a pěnové buňky. VCAM-1 se vyskytuje v místech, které mají predispozici k ateroskleróze a po obvodu objevených lézí [19, 49].

VCAM-1 interaguje s mononukleárními leukocyty, eozinofily a bazofily. Může také aktivovat lidské T lymfocyty.

VCAM-1 obsahuje N-konec, sérii 6 nebo 7 extracelulárních imunoglobulinových domén, transmembránovou oblast a cytoplazmatický konec.

Domény 1 a 4 jsou specifická vazebná místa pro vazbu $\alpha 4\beta 1$ integrinu a někdy pro vazbu $\alpha 4\beta 7$ integrinu (viz obr 5) [20].

Obrázek 5 Schématické znázornění stavby adhezní molekuly VCAM-1 se znázorněnými vazebnými místy $\alpha 4\beta 1$ integrinu a $\alpha 4\beta 7$ integrinu [21].



4.2 Funkce VCAM-1 a regulace její exprese ve vztahu k endotelu

VCAM-1 hraje dominantní roli v iniciaci aterosklerózy. Při tvorbě aterosklerotických lézí dochází k hromadění monocytů v tunica intima arterií.

VCAM-1 se váže na $\alpha 4\beta 1$ integrin, případně na $\alpha 4\beta 7$ integrin. Ty jsou exprimovány v monocytech, lymfocytech a eozinofilech. Vnější signály VCAM-1 jsou zprostředkovány nikotinamin adenin dinukleotid fosfát (NADPH) oxidázou. NADPH oxidáza produkuje reaktivní formy kyslíku (ROS), ty následně aktivují matrix metaloproteináz. Tyto signály jsou potřebné pro změny tvaru endotelových buněk a migraci leukocytů.

Za fyziologických podmínek není VCAM-1 běžně exprimována. V případě, že je endotel vystavován zánětlivým cytokinům, příkladem mohou být tumor nekrotizující faktor (TNF) nebo interleukin 1b (IL-1b), stává se endotel aktivním. Tímto dochází k rychlejší genové expresi a expresi VCAM-1 na cévním endotelu. U myší, králíků a lidí je VCAM-1 stimulována již u časných fází aterosklerotických lézí a to především na periférii. Výskyt této molekuly je omezený do oblastí lézí a míst s jejich predispozicí. Zatímco ICAM-1 se může vyskytovat v nepoškozené aortě a v místech bez aterosklerotické léze [15, 19, 22, 23, 46, 54].

VCAM-1 může stabilizovat adhezi leukocytů na endotel a podílí se na diapedezi. VCAM-1 pravděpodobně přispívá také k vychytávání mononukleárních leukocytů (ne neutrofilů) [15].

Mimo aterosklerotických lézí je VCAM-1 indukována na buňkách endotelu při zánětlivých střevních onemocněních, infekcích a astmatických reakcích [23].

5 Endoglin

Endoglin (CD 105) je homodimerní transmembránový glykoprotein, který se skládá ze dvou disulfidických podjednotek o velikosti 95 kDa. Analýzou byl zjištěn výskyt endoglinu v zona pellucida (ZP). Gen pro kódování endoglinu se nachází na 9. chromozomu a obsahuje 15 exonů. Zároveň byly identifikovány dvě izoformy endoglinu, lišící se délkou intracelulární domény. Predominantní L-izoforma má 47 aminokyselin, S-izomorfa má aminokyselin pouze 14 a je tedy minoritní forma. Obě izoformy mohou vázat své přirozené ligandy, liší se úrovní jejich fosforylace a schopností ovlivnit signalizaci TGF- β . Obě izoformy endoglinu interagují s receptory ALK-1 (active receptor like kinasa 1) a ALK-5 (active receptor like kinasa 5), rozdíl je v síle afinity ke každému receptoru [24].

L-endoglin má angiogenní účinky, kdežto S-endoglin má účinky antiangiogenní. S-endoglin zároveň snižuje expresi eNOS. Bylo prokázáno, že zvyšující se S-izoforma ve stárnoucích endotelových buňkách přispívá ke kardiovaskulárním onemocněním, které souvisejí se stárnutím [25, 26].

Expres endoglinu byla prokázána v cévách s aterosklerózou, a to především v buňkách endotelu a hladkých svalových buňkách, což potvrzuje jeho účast v aterogenezi. V menší míře je endoglin exprimován fibroblasty nebo makrofágy. Dále je exprese endoglinu pozorována u hypercholesterolémie, akutního infarktu myokardu nebo nádorových onemocněních [25, 26, 27].

5.1 Funkce endoglinu

Endoglin hraje důležitou roli ve správném vývoji a funkci cév a je klíčový pro udržení homeostázy endotelových buněk. Endoglin je také koreceptor signální dráhy transformujícího růstového faktoru beta (TGF- β). TGF- β je rodina polypeptidů, které různě ovlivňují buněčný růst, diferenciaci, adhezi, apoptózu a mají vliv na tvorbu mezibuněčné hmoty [25, 26].

Díky vazbě na membránové receptory (TGF- β receptor typu I a II) je možná signalizace TGF- β cytokinu. Zde má molekula endoglinu roli tzv. přídatného receptoru, ta reguluje jejich fosforylaci a také schopnost signalizace.

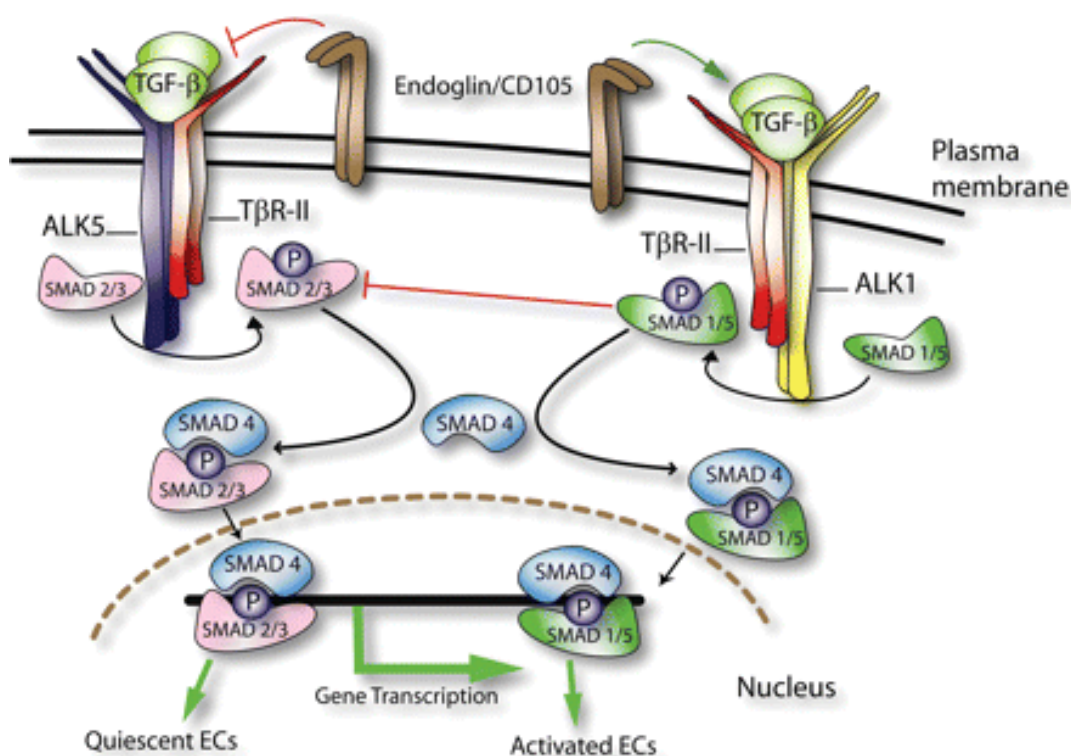
V endotelových buňkách existují dvě cesty TGF- β typu I, které mají opačný efekt.

ALK-1 způsobuje fosforylaci proteinů Smad1 a Smad5. Tyto proteiny přispívají endotelové buněčné proliferaci a migraci.

ALK-5 fosforyluje Smad2 a Smad3. Tyto proteiny naopak inhibují buněčné odpovědi na TGF- β .

Endoglin je důležitý pro udržení rovnováhy mezi TGF- β /ALK-1 a TGF- β /ALK-5, kdy zvyšuje TGF- β /ALK-1 a inhibuje TGF- β /ALK-5 signalizaci (viz. obr. 6) [24].

Obrázek 6 Schéma znázorňující předpokládané role endoglinu v TGF- β /ALK-1 a TGF- β /ALK-5 signalizační kaskádě buněk endotelu. [24].



Studie poslední doby poukazují na schopnost endoglinu ovlivnit vazodilataci za pomoci oxidu dusnatého (NO). NO, který je odvozován od endotelové NO syntázy (eNOS) je důležitým vazodilatačním faktorem. Jak bylo uvedeno dříve, ta reguluje tonus krevního řečiště, tím udržuje anti-trombotické, anti-proliferativní a anti-apoptické prostředí v cévní stěně. Upravením Smad2 hladiny může endoglin in vitro zvyšovat expresi eNOS [27].

6 Myší modely aterosklerózy

Pod pojmem ateroskleróza se ukrývá komplexní a progresivní onemocnění. K jejich popisu jsou používány informace získané u lidských a zvířecích lézí. Donedávna byly výzkumy prováděny především na králíčích a prasečích modelech, a také na modelech primátů. Tyto velké zvířecí modely přinesly značné obohacení v této oblasti výzkumu. V posledních letech jsou ale stále častěji užívány především myší modely k in vivo studiím aterogenních mechanismů [28, 29].

Myši, oproti jiným druhům zvířat, jsou pro výzkum aterosklerózy výhodnější. Výhodou je velké množství genetických modifikací, rychlé množení myši a nízké náklady na chov. Díky jejich velikosti jsou vhodné pro testování nových látek, proto je spotřeba zkoumaných látek mnohem menší. Z hlediska aterosklerotických lézí jsou myši schopné vytvářet léze v rozsahu od jednoduchých pěnových buněk po komplexní léze. Nevýhodou může být malé množství materiálu, právě kvůli drobné stavbě těla myši. [28].

V porovnání s lidmi mají myši přirozeně vyšší vysokodenzitní lipoprotein (HDL) oproti nízkodenzitnímu lipoproteinu (LDL) v plasmě. HDL podporuje silnou odolnost proti ateroskleróze. Proto je potřeba výrazně ovlivnit ostatní plazmatické lipoproteiny dietními opatřeními, a tím podpořit tvorbu aterosklerotických lézí. Ty jsou srovnatelné s lézemi, které se vyskytují u lidí.

Rozlišujeme dva základní myší modely aterosklerózy, od těch pak mohou být odvinuty modely další. Hlavními modely jsou apolipoprotein E deficitní ($ApoE^{-/-}$) myši a LDL receptor deficitní ($LDLr^{-/-}$) myši. U těchto modelů jsou nízké plazmatické hladiny apoB-lipoproteinů zvýšeny na aterogenní úroveň odstraněním buď ligandu ($ApoE^{-/-}$) nebo receptoru ($LDLr^{-/-}$). Tyto zvířecí modely jsou široce uznávané a dále geneticky upravované pro další studium genů, které mohou hrát roli v mechanismu aterosklerózy. [30, 50].

6.1 Apolipoprotein E deficitní myši

Apolipoprotein E (ApoE) je glykoprotein o velikosti přibližně 34 kDa. ApoE je jak u lidí, tak u myši syntetizován v játrech, mozku, makrofázích a je součástí chylomikronů a chylomikronových remnant, velmi nízkodenzitních lipoproteinů (VLDL), intermediálních lipoproteinů (IDL) i HDL. Mezi nejdůležitější funkce patří vázat lipoproteiny k apolipoproteinu B (ApoB) a ApoE receptorům nebo receptoru chylomikronových remnant, což umožňuje játrům vychytávání částic obsahujících ApoE [31, 32].

Genetickou inaktivací ApoE genu byl vytvořen model apolipoprotein E deficitní ($\text{ApoE}^{-/-}$) myši. K inaktivaci genu dochází homologní rekombinací embryonálních kmenových buněk myši. V současnosti jsou $\text{ApoE}^{-/-}$ myši nejpoužívanějším dostupným modelem v rozvoji vaskulárních lézí a zároveň velice podobné těm, objeveným u člověka.

U $\text{ApoE}^{-/-}$ myši, které byly krmeny standardní dietou došlo k posunutí plazmatických lipoproteinů z HDL do VLDL a chylomikronů, tedy většina lipoproteinových frakcí byla aterogenní. Hladina plazmatického cholesterolu vzrostla přibližně 8x (především VLDL a chylomikronová hladina). HDL hladina zůstala stejná nebo došlo k jejímu snížení. U stejných $\text{ApoE}^{-/-}$ myši, které byly krmeny vysokotukovou dietou, došlo k dramatickému nárůstu plazmatického cholesterolu, a to až 14x (především u frakcí VLDL a IDL).

Pokud jsou $\text{ApoE}^{-/-}$ myši krmeny normální dietou, dochází k přilnutí monocytů k buňkám endotelu a k poškození subendotelové elastické laminy v 6. až 8. týdnu věku. K lézím obsahujícím pěnové buňky a hladké svalové buňky dochází v 8. až 10. týdnu věku myši. Fibrózní pláty se vyskytují v 15. až 20. týdnu věku. Přibližně 70 týdnů staré $\text{ApoE}^{-/-}$ myši vykazují neprůchodnost průsvitu aorty přes 90 %. Stejně procento neprůchodnosti vykazují myši krmené vysokotukovou dietou již v 32. týdnu věku, tedy méně než polovina věku [32].

Nejčastější místa vzniku aterosklerotických lézí u $\text{ApoE}^{-/-}$ myši jsou kořen aorty, aortální oblouk, karotidy, plicní a renální aorty [33].

ApoE^{-/-} myši model je podobný tomu lidskému, protože zvyšuje hladinu celkového plazmatického cholesterolu a ukládání lipidů ve velkých arteriích. Toto je umocněno a urychleno podáváním vysokotukové diety, stejně jako u člověka [32].

6.2 LDL receptor deficitní myši

LDL receptor (LDLr) odstraňuje IDL a LDL z plazmy a tím snižuje její hladinu cholesterolu. LDLr váže nejen LDL obsahující ApoB100, ale také VLDL a chylomikrony, které obsahují ApoE [34].

Na klasické dietě, LDLr^{-/-} myši, nevede tento model k ateroskleróze. LDLr^{-/-} model je naopak velice citlivý na aplikovanou vysokotukovou dietu. Po užití vysokotukové diety došlo k rozvoji velkých lézí, které nejsou tak dobře charakterizovány jako u ApoE^{-/-} myši [31].

6.3 ApoE/LDL receptor-deficientní myši (ApoE^{-/-}/LDLr^{-/-})

V tomto případě se jedná o model tzv. dvojnásobně knokautované myši ApoE/LDL receptor-deficientní (ApoE^{-/-}/LDLr^{-/-}), tedy je vypnut jak gen ApoE, tak i gen pro LDL receptor. Tento model rozvíjí silnou hyperlipidémii i aterosklerotické pláty již při standardní dietě [35]. Podobně jako u ApoE^{-/-} myši je zvýšená hladina VLDL, chylomikronových frakcí a navíc LDL částic. K ještě vyššímu vzestupu těchto částic dochází po podání vysokotukové diety [34].

Léze jsou pozorovatelné již v 15 týdnech u myši krmených standardní dietou. ApoE^{-/-}/LDLr^{-/-} myši tedy není nutné krmit vysokotukovou dietou pro studium antiaterosklerotického účinku vybraných látek. Toto je velikou výhodou modelu ApoE^{-/-}/LDLr^{-/-} [35, 36].

7 Imunohistochemické metody

Metoda je založena na průkazu antigenu ve tkáni, který se váže se specifickými protilátkami. Výsledek reakce je následně zviditelněn značkou (markerem). Imunohistochemicky je možné detekovat i neaktivní enzymy a jejich prekurzory či proteiny bez enzymatické aktivity. Používané protilátky jsou polyklonální nebo monoklonální.

Polyklonální protilátky

Polyklonální protilátky představují množinu imunoglobulinů, ta reaguje na jedné molekule s množstvím antigenních epitopů. Často sérum imunizovaného zvířete.

Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky vytvářejí klon (potomstvo) pouze jedné buňky. Vznikají metodami hybridomové technologie [37, 38, 39, 51].

7.1 Přímá a nepřímá imunohistochemie

Přímá imunohistochemie

Přímá imunohistochemie (viz obr. 7) je metodou jednokrokovou. Reaguje tedy přímo označená protilátka, která se naváže na antigen. Jako markery jsou používány fluorochromy, enzymy nebo částice koloidního zlata. Metoda je užívána hlavně pro nativní řezy.

Nevýhodou této metody je nízká citlivost, které se předchází použitím vyšší koncentrace dané protilátky.

Obrázek 7 Znázornění přímé metody imunohistochemie, shora antigen, primární protilátka, fluorochrom (koloidní zlato) [48].

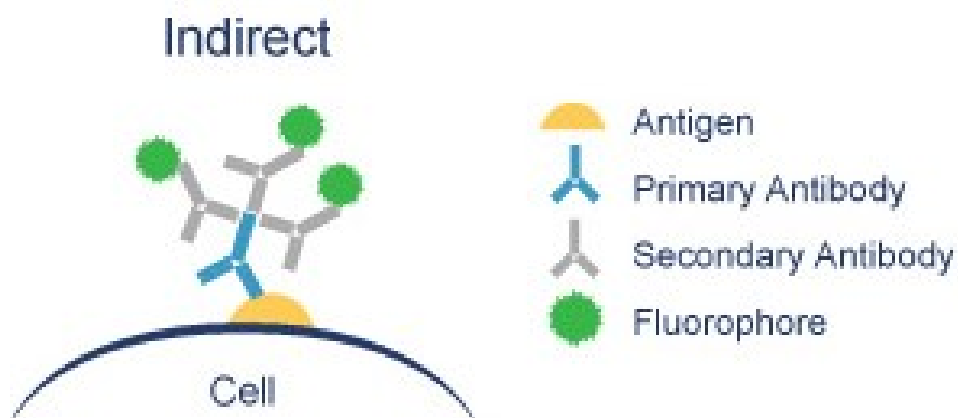


Nepřímá imunohistochemie

Nepřímá imunohistochemie (viz obr. 8) je metoda o dvou krocích. V prvním kroku dojde k navázání protilátky (monoklonální nebo polyklonální) na antigen, v dalším kroku reaguje označená sekundární polyklonální protilátka s protilátkou z kroku prvního.

Tato metoda je v současnosti nejpoužívanější také díky své vyšší citlivosti.

Obrázek 8 Znázornění nepřímé metody imunohistochemie, shora antigen, primární protilátka, sekundární protilátka, fluorochrom (enzym) [48].



Nepřímá trojstupňová metoda

Nepřímá trojstupňová metoda je metoda sloužící k zesílení signálu v případech, kdy je množství molekul antigenu ve tkáni nízké.

Výhodou metody je vysoká citlivost, časově je ovšem náročnější.

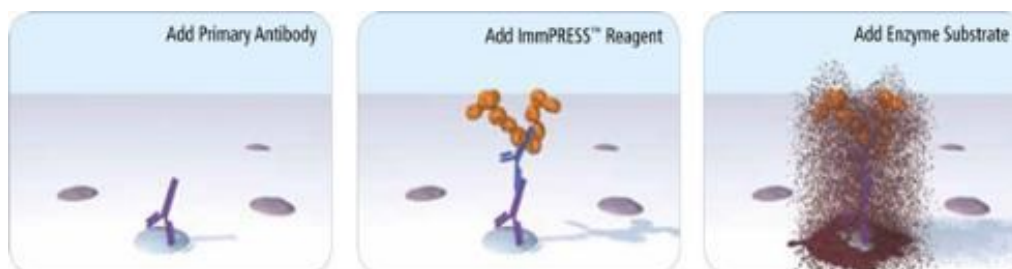
Příkladem může být metoda peroxidáza-anti-peroxidázového komplexu (PAP) nebo technika avidin-biotin complex (ABC metoda), (viz kap. 8.2) [37, 38, 40].

7.2 ImmPressTM a EnVision[®] metodika

ImmPressTM metodika (polymerized reporter enzyme staining systém)

Vysoce senzitivní, jednokrokový systém je novou metodou konjugace a mikropolymerní chemie. Používané mikropolymery s vysoce aktivní peroxidázou a jejich připojením k sekundární protilátce bez použití dextranu nebo jiné makromolekuly jako nosiče, umožňují dobře rozpoznatelné antigeny (hlavně antigeny jaderné a membránové) s minimálně nespecificky barevným pozadím. ImmPRESSTM Polymer Detection Systém potlačuje reakci s jinými činidly na bázi polymeru, tím jsou dosaženy lepší výsledky. Tento systém je vhodný pro značení několika antigenů najednou. Nejčastějším enzymem je křenová peroxidáza s vysokou aktivitou navázaná k sekundární protilátce, která se vyznačuje vysokou afinitou k primární protilátce (viz obr. 9) [41].

Obrázek 9 Grafické znázornění principu barvení metodou ImmPressTM [42].

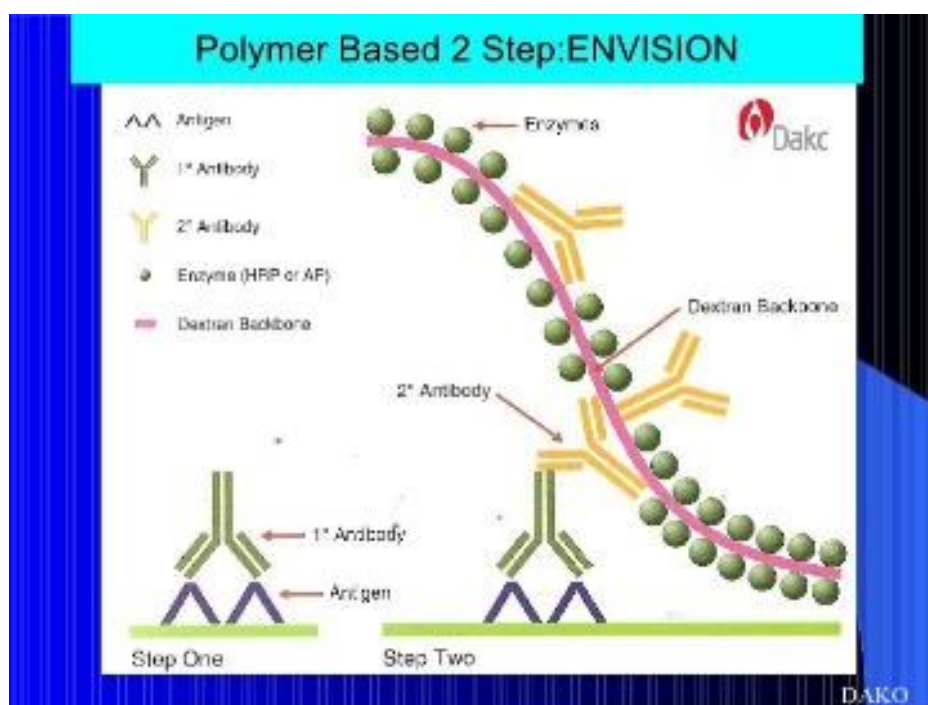


EnVision® metodika

Jedná se o nepřímou imunohistochemickou metodu. Technika je dvoukroková, kdy dochází k barevné změně. Primární protilátka je následována polymerním konjugátem. Ten se skládá z velkého množství křenové peroxidázy a sekundární protilátky, která je navázána na aktivovaný polymerový nosič – dextran (viz obr. 9).

Výhodou metody je citlivost a jednoduchý postup, je vhodná i pro detekci antigenů vyskytujících se ve tkáních ve velmi nízkých koncentracích [43, 44].

Obrázek 10 Schématické znázornění barvení technikou EnVision® [43].



7.3 Avidin-Biotin Complex metodika

Avidin-Biotin Complex metoda (ABC metoda) je nepřímá, druhově nespecifická trojstupňová technika. Tato technika pracuje s vaječným glykoproteinovým bílkem avidinem, který tvoří téměř ireverzibilní vazbu s nízkomolekulárním vitamínem biotinem. Vazebná místa mohou být volná nebo

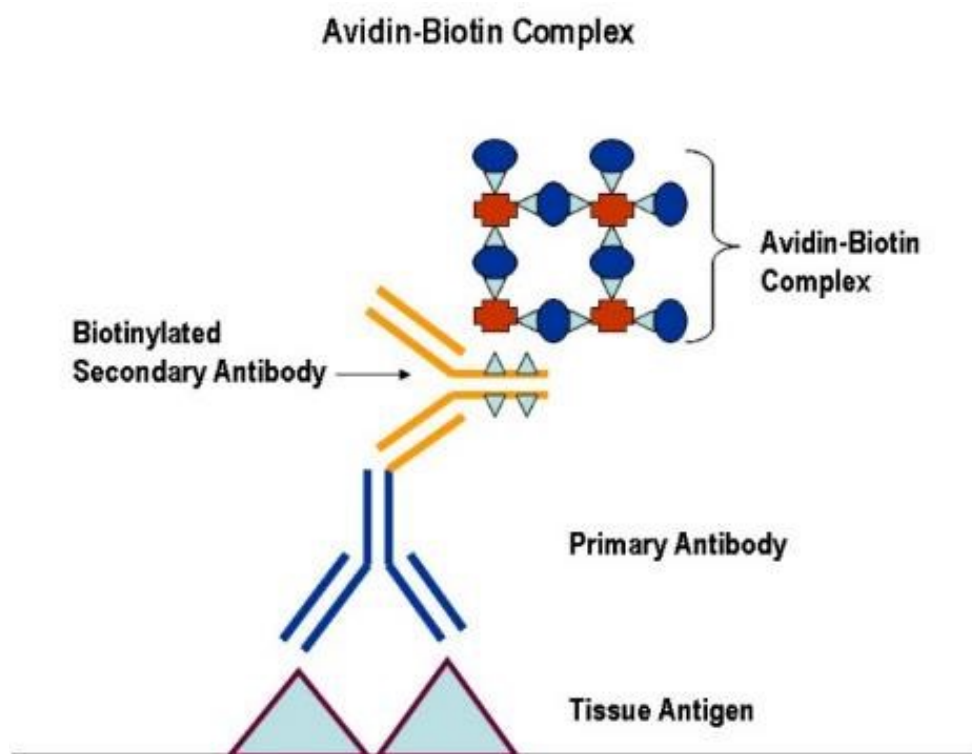
obsazená komplexem biotin-alkalickou fosfatázou. Volná místa jsou k dispozici pro navázání biotinylované protilátkové molekuly (můstku), (viz obr. 10).

Pokud je použit avidin získaný z bakterie *Streptomyces avidini*, komplex označujeme jako streptavidin-biotin komplex (SABC). Avidin z této bakterie je užíván pro svou vyšší citlivost (5-10x) než klasická ABC metoda.

Jako první se naváže primární protilátka na tkáňový antigen. Poté je přidána biotinylovaná sekundární protilátka, která tvoří tzv. můstek. Následně dojde k navázání (strept)avidin-biotinového komplexu, který je označen křenovou peroxidázou. Nakonec je přidán enzymatický substrát pro zviditelnění reakce.

ABC, příp. SABC metoda je v současnosti jedna z nejrozšířenějších a nejcitlivějších [37, 38, 40, 45, 55].

Obrázek 11 Schématické znázornění barvení Avidin-Biotin Complex metodou [45].



II. PRAKTICKÁ ČÁST

8 Cíl práce, zadání práce

- Sledování změn exprese endoglinu a VCAM-1 v aortě myši po podání standardní a vysokotukové diety pomocí imunohistochemických metod
- Porovnání výsledků imunohistochemického barvení jednotlivých skupin myši

9 Zvířata

Studie na zvířatech splňovaly kritéria pro experimentální použití laboratorních zvířat. Veškeré protokoly byly schváleny etickou komisí na ochranu zvířat proti týrání na Farmaceutické fakultě, Karlovy univerzity v Praze. Experimenty byly vykonávány v souladu se zákonem České republiky č. 246/1992.

Dvouměsíční samice myši kmene C57BL/6J (B6), (n = 12), (Velaz, sro, Česká republika) byly náhodně rozděleny do dvou skupin. První (n = 6) byla krmena standardní dietou. Druhá skupina (n = 6) byla krmena dietou s vysokým obsahem tuků. Tato dieta obsahovala 1,25 % cholesterolu a 40 % tuku (Research Diets, Inc., NJ, USA), myši byly krmeny po dobu následujících 3 měsíců. Zároveň byla monitorována spotřeba potravy. Žádné rozdíly nebyly pozorovány jak mezi jednotlivými zvířaty ve skupině, tak mezi skupinami navzájem.

Na konci léčebného období byla zvířata přes noc vyhladověna a následně usmrcena. Aorty, nasedající k horní polovině srdce, byly odebrány a ponořeny do OCT zalévacího media (Leica, Praha, Česká republika), rychle zmrazeny v kapalném dusíku a skladovány při -80 °C. Následně byly barveny imunohistochemicky.

Jednotlivé sekce srdce byly řezány až ke kořenu aorty obsahující semilunární chlopně společně s aortou. Od tohoto místa bylo vytvořeno 30 sériových řezů (tloušťka 7 mm) z každé myši u obou skupin. Řezy byly nakrájeny v kryostatu a umístěny na želatinou potažená sklíčka.

10 Imunohistochemie

Po rozmrazení na vzduchu byly řezy ponořeny do roztoku PBS („phosphate-buffered saline“) po dobu 5 minut. PBS je směs solí, která slouží jako pufr. Tento roztok byl připraven naředěním koncentrovaného PBS s vodou v poměru 1:10. V dalším kroku bylo na řezy na 30 minut nanášeno mléko Blotto for Western (Alpha Diagnostic Intl. Inc., USA). Mléko bylo rozpuštěné v PBS a slouží k vysycení tkáně bílkovinami, zamezuje se tím nespecifické vychytávání specifické protilátky. Poté bylo mléko ze sklíček sklepnuto a ihned byla nanášena primární protilátka na 60 minut. Po hodinovém působení primární protilátky byly řezy ponořeny do PBS na 2x5 minut a vloženy na 15 minut do 3% roztoku H_2O_2 . Roztok H_2O_2 byl vytvořen smícháním 8 ml H_2O_2 se 70 ml ředěné PBS a má za úkol blokovat přirozené peroxidázy, které se vyskytují ve vzorcích, a tím potlačit nespecifické barvení. Opět byly řezy ponořeny do roztoku PBS na 2x5 minut. Následně byla použita sekundární protilátka a enzym peroxidáza, který se navázal na sekundární protilátku. Inkubace trvala 30 minut a opět byl použit roztok PBS na 2x5 minut. Jako další byl na vzorky nanášen chromogen 3,3-diamobenzidín v pufru (DAB, Dako, Dánsko) v poměru 1:5, ten reaguje s peroxidázou a poskytuje hnědé zabarvení místa specifické reakce. U endoglinu na každý vzorek působil DAB po dobu 15 sekund u VCAM-1 po dobu 25 sekund. Po uplynutí času byly opět vzorky ponořeny do roztoku PBS.

Všechny vzorky byly následně ponořeny do hematoxylinu na 5 sekund, pro obarvení jader. Další 1 minutu docházelo k modrání pod tekoucí vodou. Poté byla sklíčka odvodněna ponořením do acetonu, na 3 minuty do aceton-xyleny (10:1) a na další 3 minuty do aceton-xyleny (1:10). V poslední fázi byly řezy vloženy do xyleny na 2 minuty, toto bylo opakováno třikrát. Nakonec byla sklíčka zamontována za pomoci eukittu.

Byly použity následující protilátky:

VCAM-1

- Primární protilátka anti VCAM-1 rat anti-mouse (Purified Rat Anti-Mouse CD 106, BD PharmingenTM, USA), (ředění 1:100)
- Sekundární protilátka ImmPRESSTM Reagent Anti-Rat Ig (mouse adsorbed) Peroxidase (Vector Laboratories, USA)

Endoglin

- Primární protilátka anti endoglin rat anti mouse, (Purified Rat Anti-Mouse CD 106, BD PharmingenTM, USA), (ředění 1:50)
- Sekundární protilátka ImmPRESSTM Reagent Anti-Rat Ig (mouse adsorbed) Peroxidase (Vector Laboratories, USA)

Pracovní protokol VCAM-1/ Endoglin

1.	PBS	5 min
2.	Mléko	30 min
3.	Primární protilátka	60 min
4.	PBS	2x5 min
5.	3% H ₂ O ₂ (8 ml H ₂ O ₂ + 70 ml PBS)	15 min
6.	PBS	2x5 min
7.	Sekundární protilátka s peroxidázou	30 min
8.	PBS	2x5 min
9.	DAB (10 µl v 500 µl pufru)	25/15 sekund
10.	PBS	oplach
11.	Hematoxylin	5 sekund + 1 min modrání
12.	Aceton	oplach
13.	aceton-xylen (10:1) → aceton-xylen (1:10)	3 min
14.	3x xylen	2 min
15.	eukitt	

III. VÝSLEDKY

Detekce endoglinu a VCAM-1 pomocí imunohistochemické metody byla provedena v aortě u myší krmených standardní dietou (kontrolní skupina) a vysokotukovou dietou (experimentální skupina). Celkově jsme hodnotili 24 řezů, 6 řezů pro každou skupinu (viz obr. 12-35). Pozitivní reakce je na obrázcích znázorněná hnědou barvou. Reprezentativní úseky s expresí požadovaných molekul jsou v obrázcích znázorněny šipkami.

Endoglin

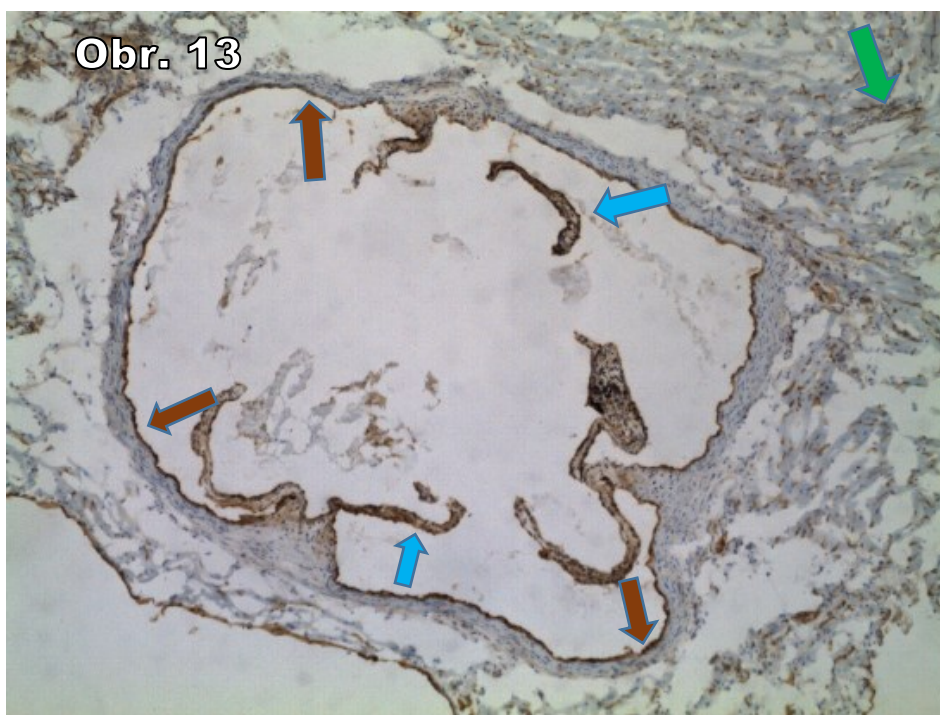
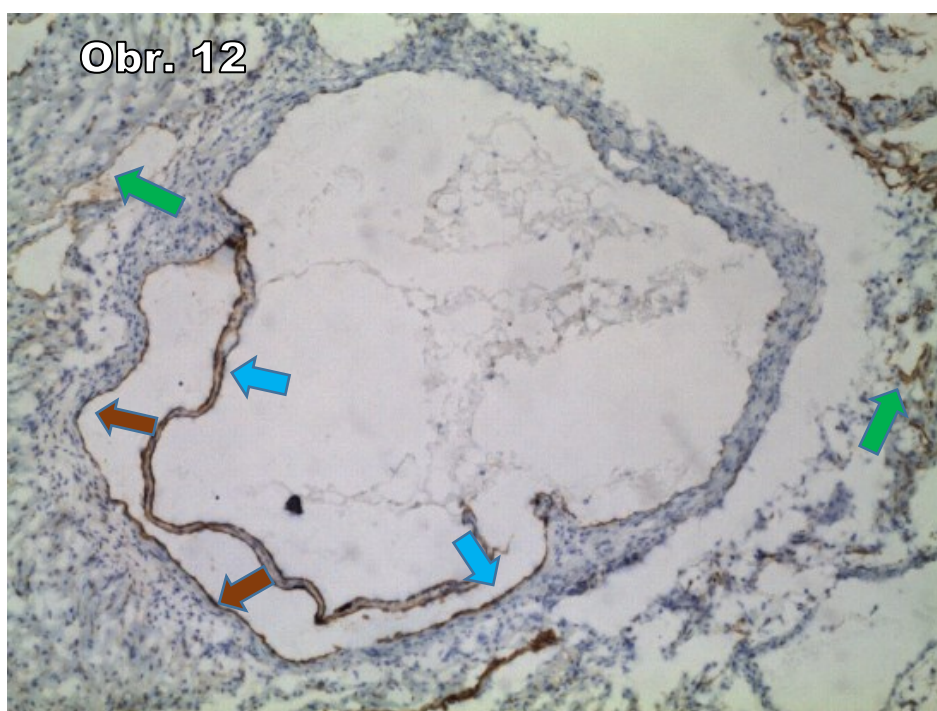
V případě endoglinu jsme pozorovali expresi u obou sledovaných skupin. U myší krmených standardní dietou jsme detekovali expresi tkáňového endoglinu na endotelu. (viz obr. 12-17). Podobnou expresi jsme pozorovali také u experimentální skupiny myší (viz obr. 18-23). Při porovnání skupin jsme v expresi nepozorovali významnější rozdíly.

VCAM-1

U imunohistochemického barvení můžeme pozorovat expresi VCAM-1 (hnědá barva) jak u kontrolních myší krmených normální dietou (viz. obr. 24-29), tak u experimentální skupiny myší (viz. obr. 30-35). Exprese je v aortě pozorovatelná opět pouze na endotelu. U kontrolní skupiny se překvapivě může exprese VCAM-1 jevit silnější než u skupiny krmené vysokotukovou dietou.

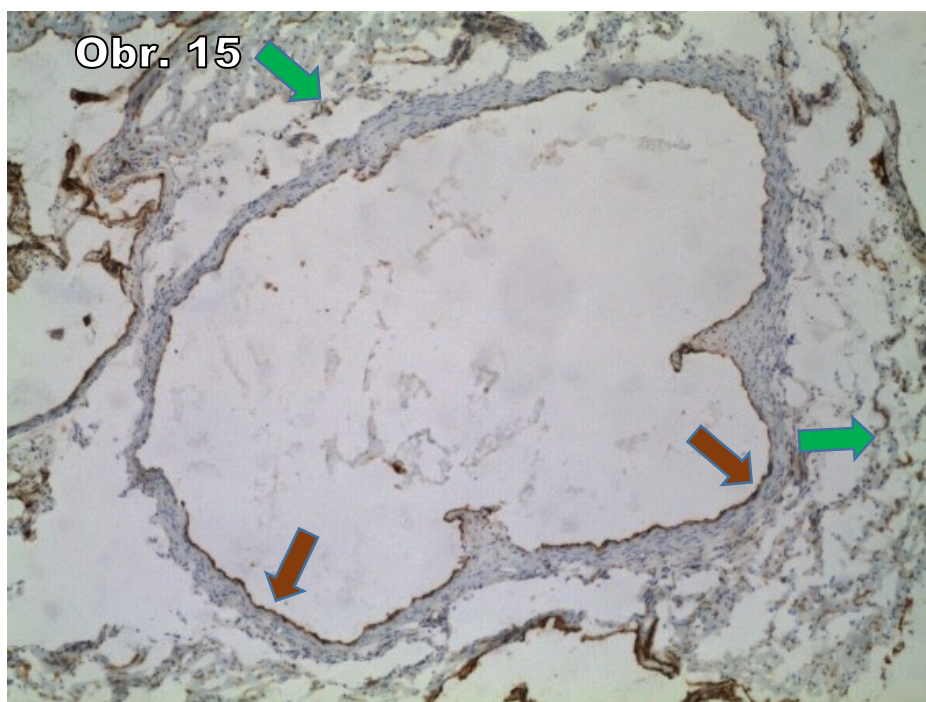
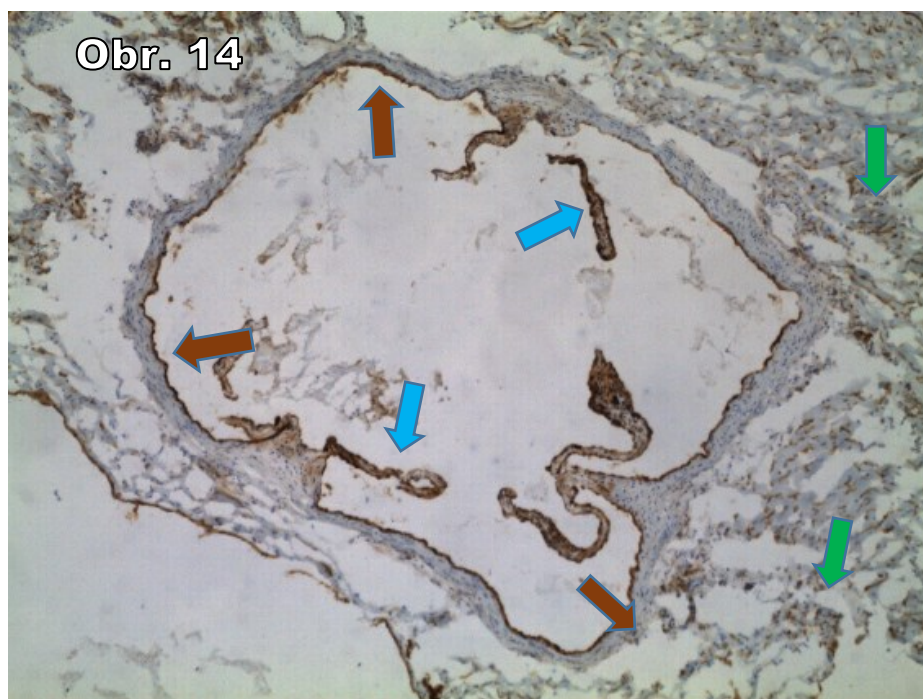
Obrázek 12, 13 exprese endoglinu, (kontrolní skupina)

Na obrázcích 12 a 13 je viditelná exprese endoglinu v aortě myši krmených normální dietou. Hnědé šipky ukazují na místa s pozitivní reakcí (hnědá barva). Dále se na obrázcích vyskytují zbytky aortálních poloměsíčitých chlopní, vyznačené modrými šipkami. Zelené šipky ukazují na pozitivní reakci pozorovatelnou mimo aortu, a to v myokardu (hnědá barva). Zvětšení 40×.



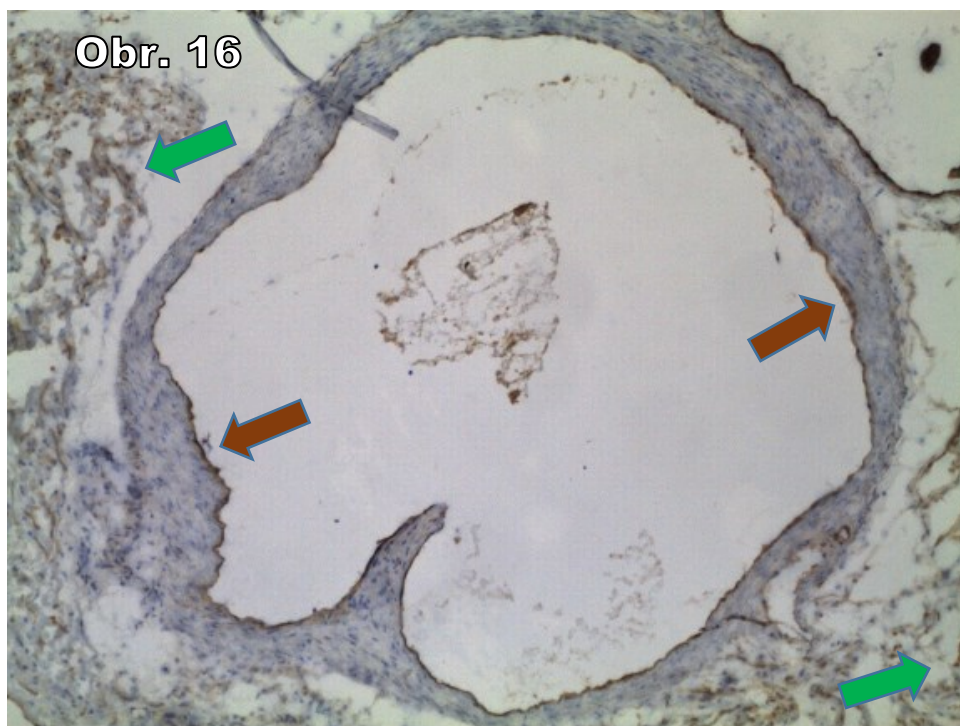
Obrázek 14, 15 exprese endoglinu, (kontrolní skupina)

Na obrázcích 14 a 15 je viditelná exprese endoglinu v aortě myší krmených normální dietou. Hnědé šipky ukazují na místa s pozitivní reakcí (hnědá barva). Dále se na obrázcích vyskytují zbytky aortálních poloměsíčitých chlopní, vyznačené modrými šipkami. Zelené šipky ukazují na pozitivní reakci pozorovatelnou mimo aortu, a to v myokardu (hnědá barva). Zvětšení 40×.



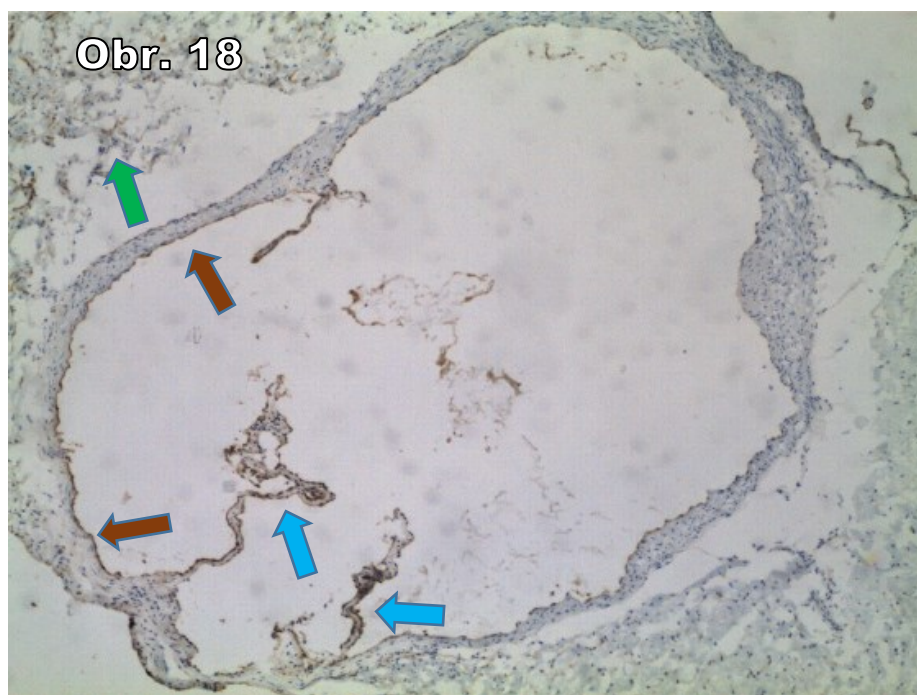
Obrázek 16, 17 exprese endoglinu, (kontrolní skupina)

Na obrázcích 16 a 17 je viditelná exprese endoglinu v aortě myší krmených normální dietou. Hnědé šipky ukazují na místa s pozitivní reakcí (hnědá barva). Zelené šipky ukazují na pozitivní reakci pozorovatelnou mimo aortu, a to v myokardu (hnědá barva). Zvětšení 40×.



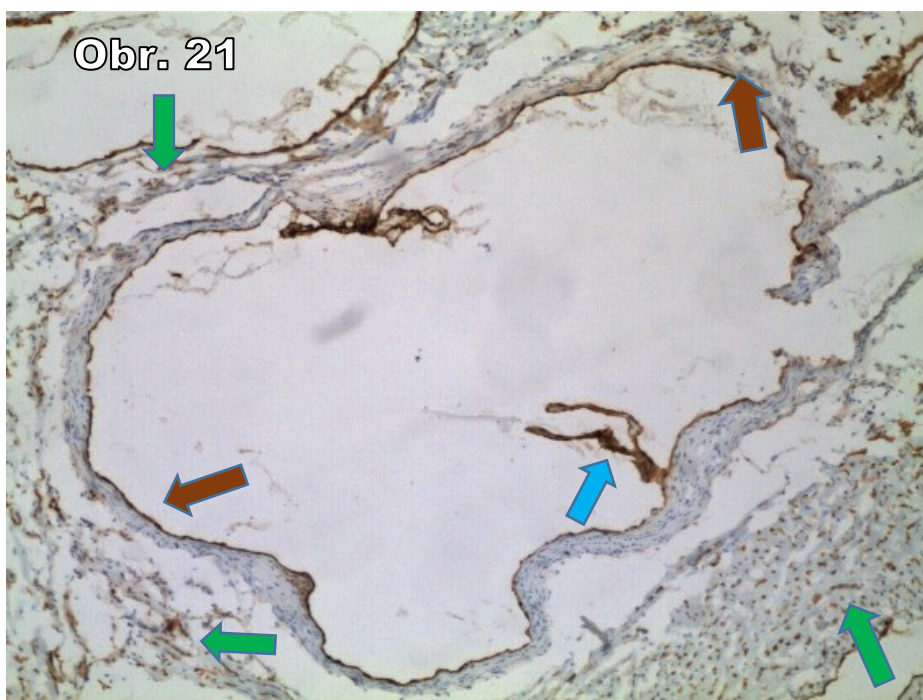
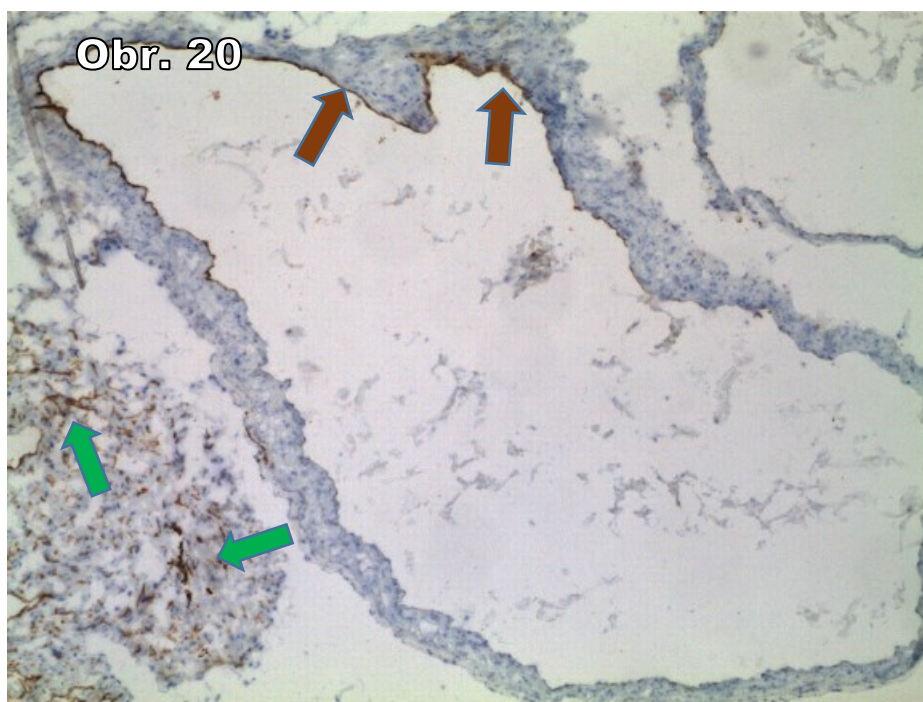
Obrázek 18, 19 exprese endoglinu, (experimentální skupina)

Na obrázcích 18 a 19 je viditelná exprese endoglinu v aortě myší krmených vysokotukovou dietou. Hnědé šipky ukazují na místa s pozitivní reakcí (hnědá barva). Dále se na obrázcích vyskytují zbytky aortálních poloměsíčitých chlopní, vyznačené modrými šipkami. Zelené šipky ukazují na pozitivní reakci pozorovatelnou mimo aortu, a to v myokardu (hnědá barva). Zvětšení 40×.



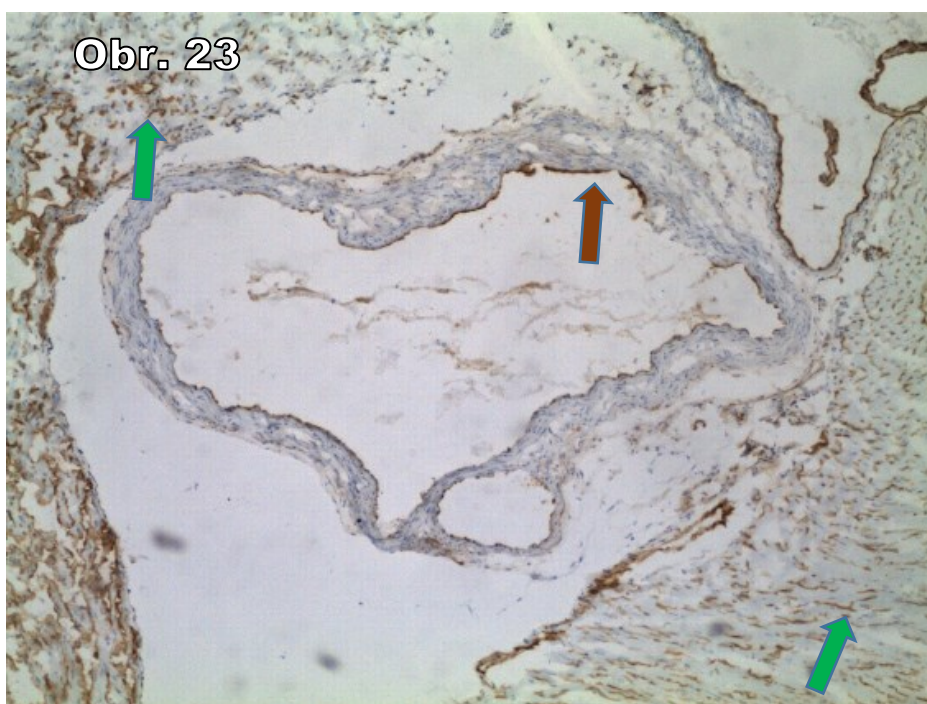
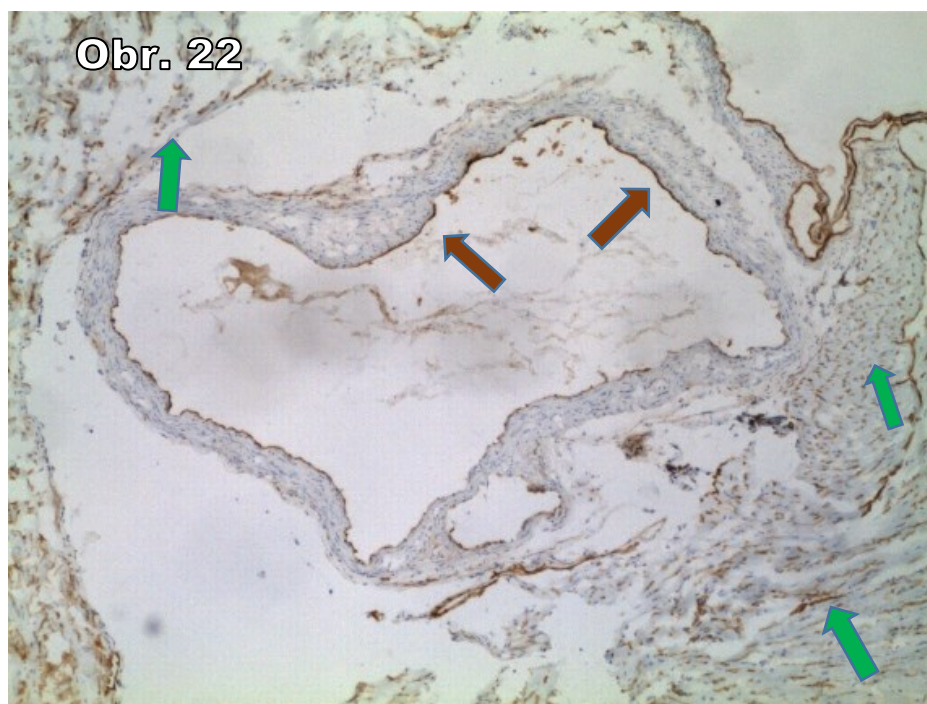
Obrázek 20, 21 exprese endoglinu, (experimentální skupina)

Na obrázcích 20 a 21 je viditelná exprese endoglinu v aortě myši krmených vysokotukovou dietou. Hnědé šipky ukazují na místa s pozitivní reakcí (hnědá barva). Dále se na obrázcích vyskytují zbytky aortálních poloměsíčitých chlopní, vyznačené modrými šipkami. Zelené šipky ukazují na pozitivní reakci pozorovatelnou mimo aortu, a to v myokardu (hnědá barva). Zvětšení 40×.



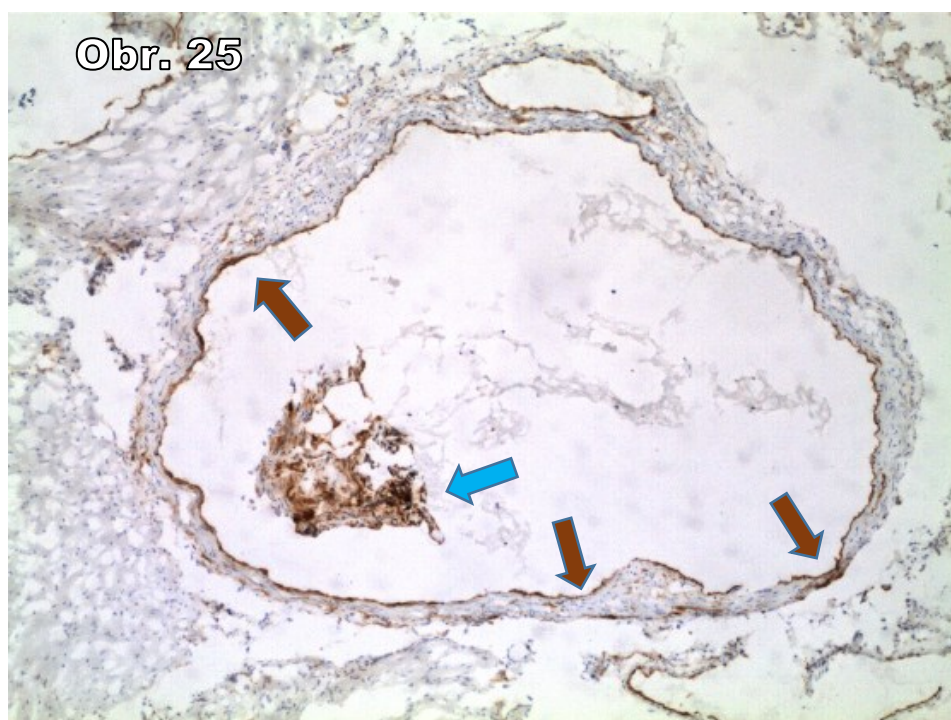
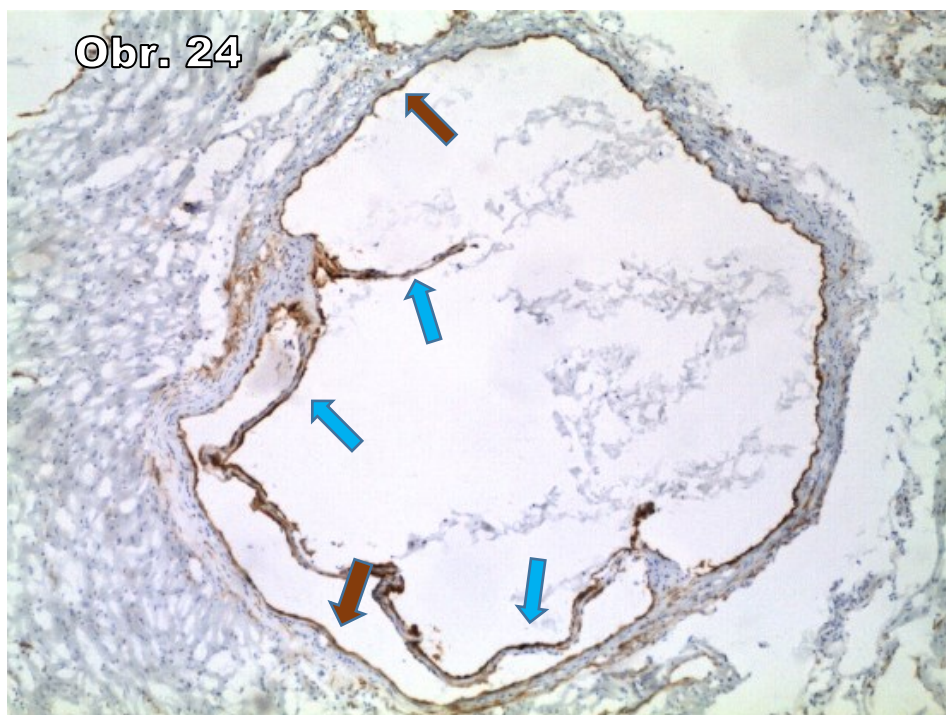
Obrázek 22, 23 exprese endoglinu, (experimentální skupina)

Na obrázcích 22 a 23 je viditelná exprese endoglinu v aortě myší krmených vysokotukovou dietou. Hnědé šipky ukazují na místa s pozitivní reakcí (hnědá barva). Dále se na obrázcích vyskytují zbytky aortálních poloměsíčitých chlopní, vyznačené modrými šipkami. Zelené šipky ukazují na pozitivní reakci pozorovatelnou mimo aortu, a to v myokardu (hnědá barva). Zvětšení 40×.



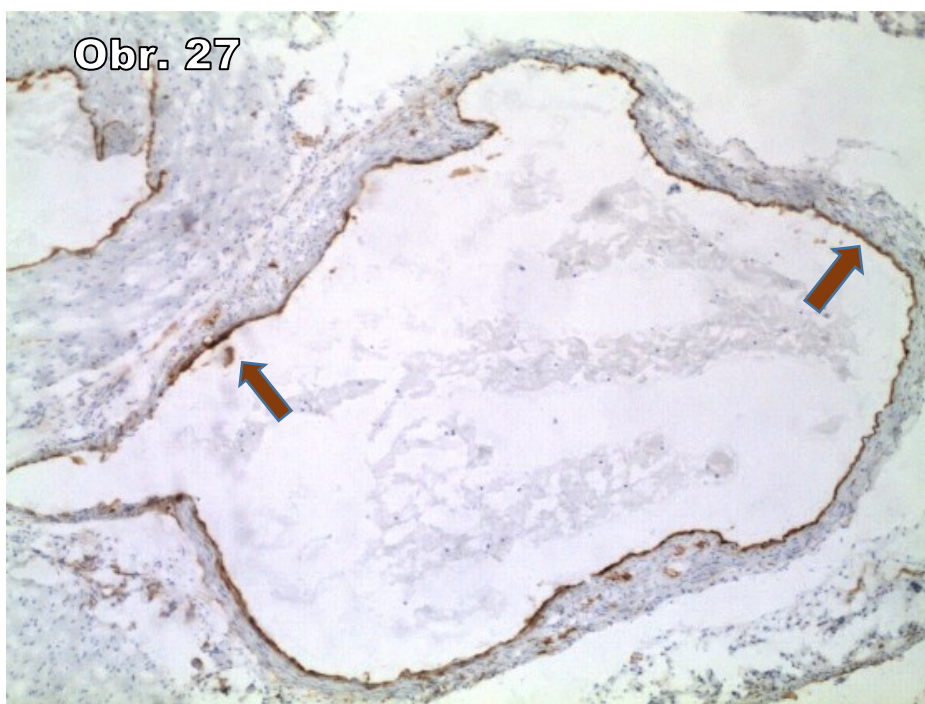
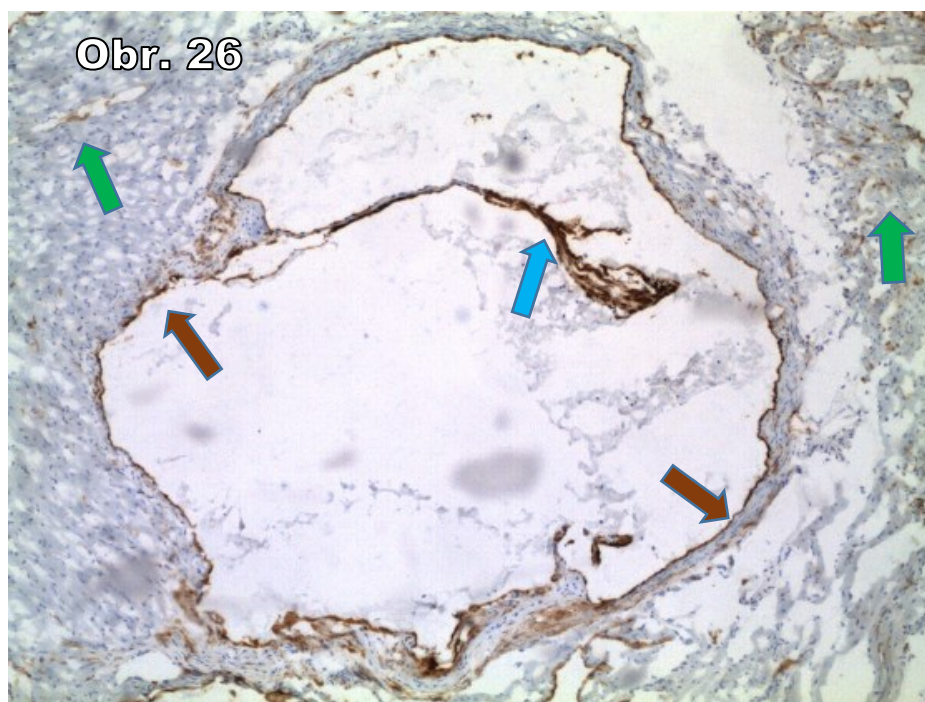
Obrázek 24, 25 exprese VCAM-1 (kontrolní skupina)

Na obrázcích 24 a 25 je viditelná exprese VCAM-1 v aortě myši krmených normální dietou. Hnědé šipky ukazují na místa s pozitivní reakcí (hnědá barva). Dále se na obrázcích vyskytují zbytky aortálních poloměsíčitých chlopní, vyznačené modrými šipkami. Zvětšení 40×.



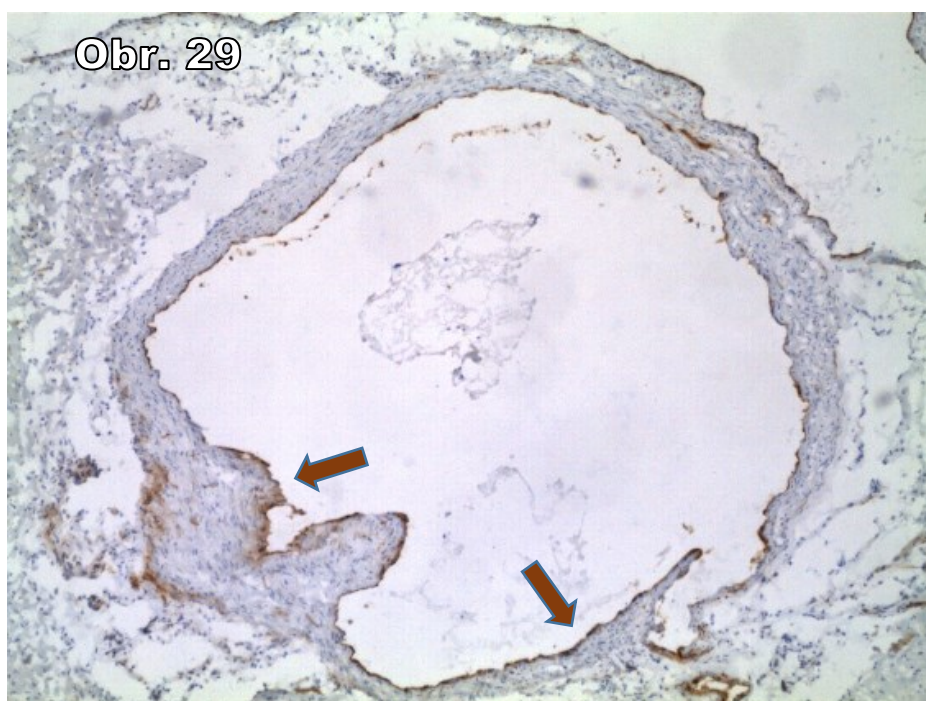
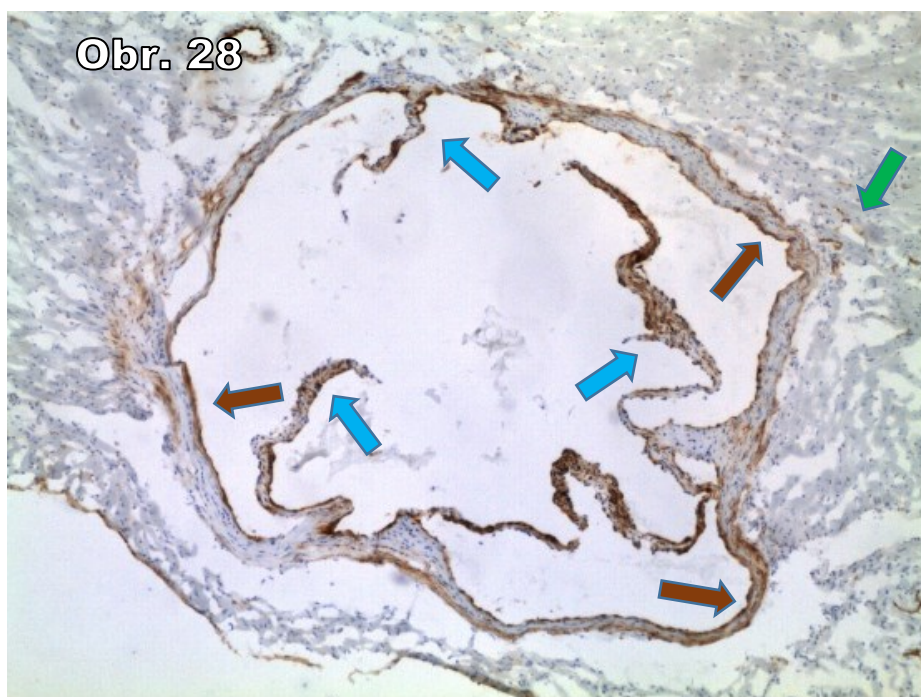
Obrázek 26, 27 exprese VCAM-1 (kontrolní skupina)

Na obrázcích 26 a 27 je viditelná exprese VCAM-1 v aortě myší krmených normální dietou. Hnědé šipky ukazují na místa s pozitivní reakcí (hnědá barva). Dále se na obrázcích vyskytují zbytky aortálních poloměsíčitých chlopní, vyznačené modrými šipkami. Zelené šipky ukazují na pozitivní reakci pozorovatelnou mimo aortu, a to v myokardu (hnědá barva). Zvětšení 40×.



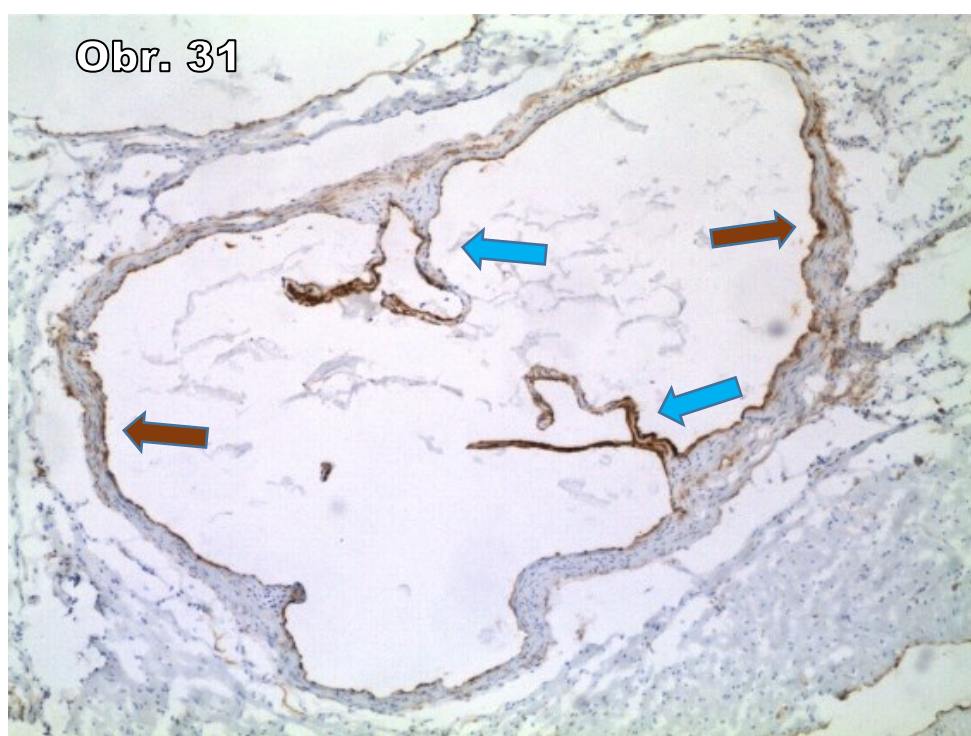
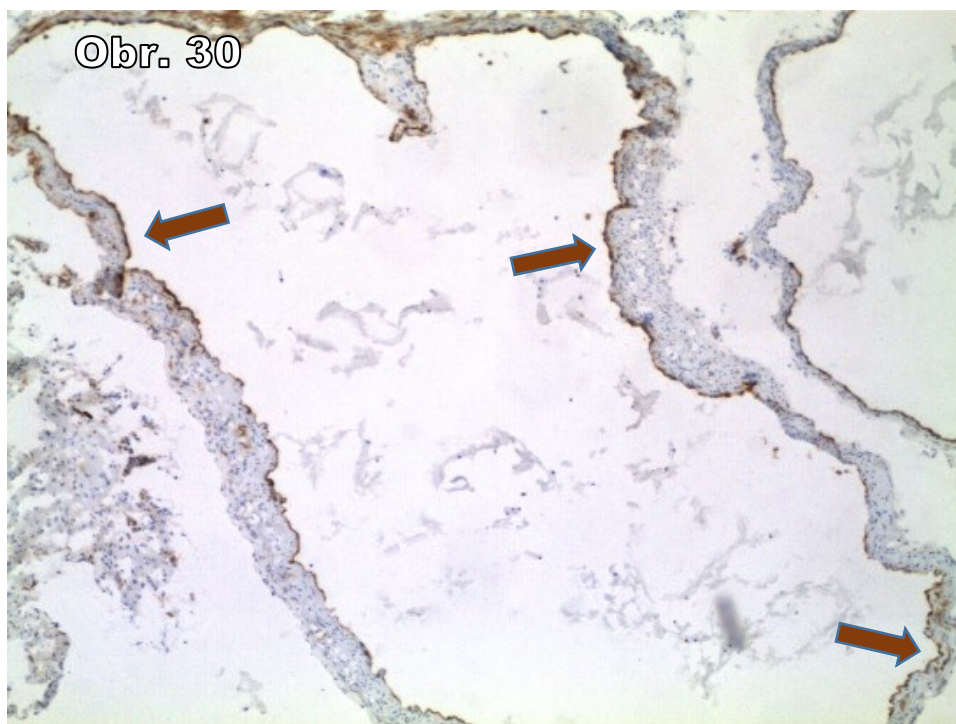
Obrázek 28, 29 exprese VCAM-1 (kontrolní skupina)

Na obrázcích 28 a 29 je viditelná exprese VCAM-1 v aortě myši krmených normální dietou. Hnědé šipky ukazují na místa s pozitivní reakcí (hnědá barva). Dále se na obrázcích vyskytují zbytky aortálních poloměsíčitých chlopní, vyznačené modrými šipkami. Zelené šipky ukazují na pozitivní reakci pozorovatelnou mimo aortu, a to v myokardu (hnědá barva). Zvětšení 40×.



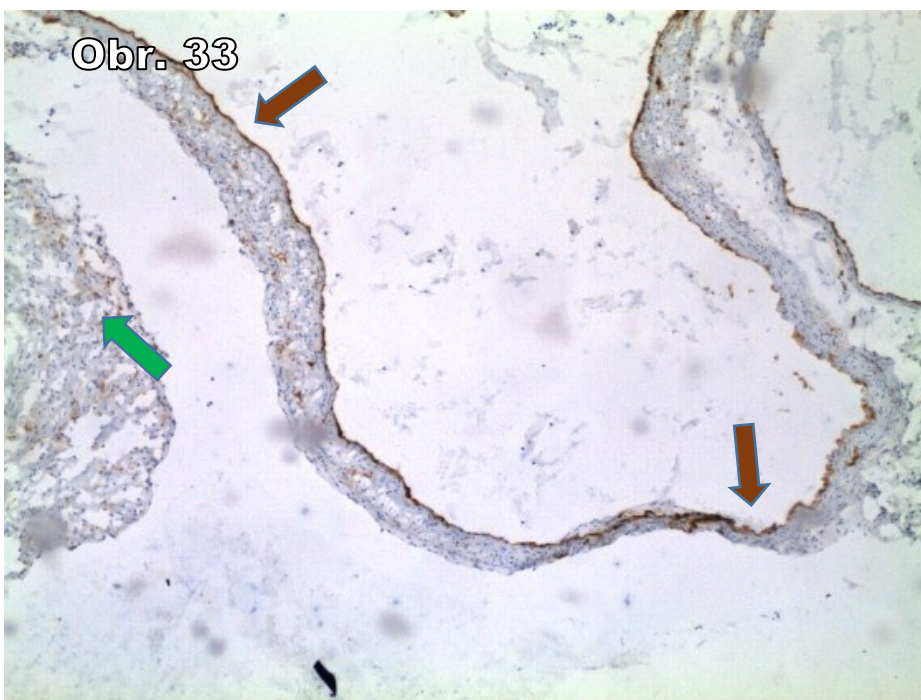
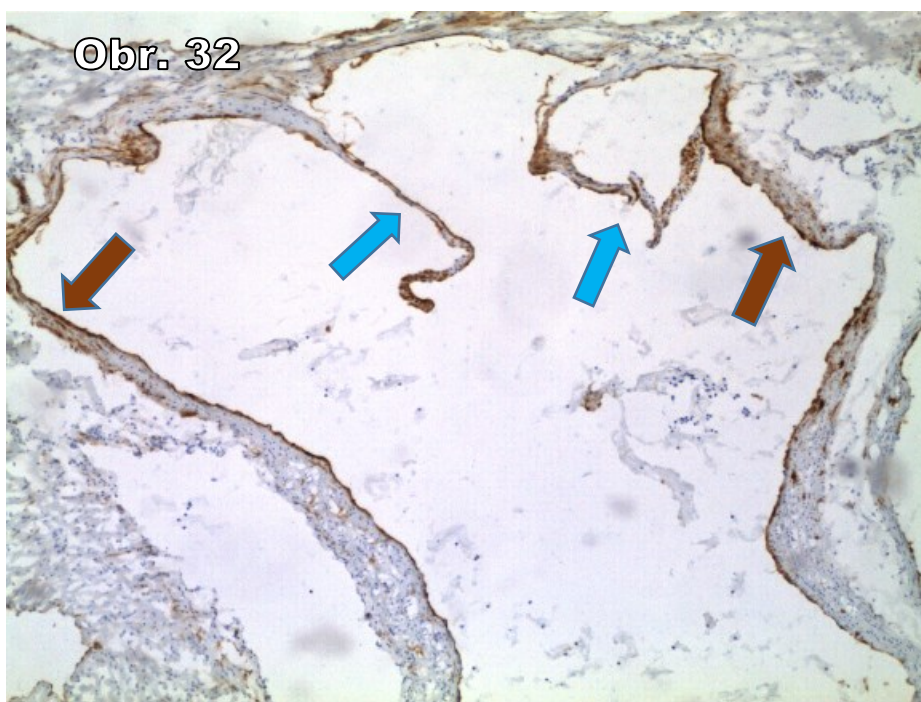
Obrázek 30, 31 exprese VCAM-1 (experimentální skupina)

Na obrázcích 30 a 31 je viditelná exprese VCAM-1 v aortě myší krmených vysokotukovou dietou. Hnědé šipky ukazují na místa s pozitivní reakcí (hnědá barva). Dále se na obrázcích vyskytují zbytky aortálních poloměsíčitých chlopní, vyznačené modrými šipkami. Zvětšení 40×.



Obrázek 32, 33 exprese VCAM-1 (experimentální skupina)

Na obrázcích 32 a 33 je viditelná exprese VCAM-1 v aortě myší krmených vysokotukovou dietou. Hnědé šipky ukazují na místa s pozitivní reakcí (hnědá barva). Dále se na obrázcích vyskytují zbytky aortálních poloměsíčitých chlopní, vyznačené modrými šipkami. Zelené šipky ukazují na pozitivní reakci pozorovatelnou mimo aortu, a to v myokardu (hnědá barva). Zvětšení 40×.



Obrázek 34, 35 exprese VCAM-1 (experimentální skupina)

Na obrázcích 34 a 35 je viditelná exprese VCAM-1 v aortě myší krmených vysokotukovou dietou. Hnědé šipky ukazují na místa s pozitivní reakcí (hnědá barva). Zvětšení 40×



IV. DISKUZE

Závažným zdravotním problémem a důvodem vysoké mortality západních kultur je ateroskleróza. Ateroskleróza může vést k rozvoji ischemické choroby srdeční, která vede až k akutnímu infarktu myokardu, angině pectoris či ischemické chorobě dolních končetin. Patogeneze aterosklerózy se tedy stala častým cílem mnohých výzkumů. V aterogenezi hraje velkou roli zánětlivý proces, kdy do aterosklerotického plátu vstupují monocyty měnící se na makrofágy a kdy dochází k infiltraci plátu leukocyty. Faktorem, který ve valné většině může vést k rozvoji tohoto onemocnění je endotelová dysfunkce [52]. Ke sledování cévního endotelu, jeho míře poškození a dysfunkce jsou používány markery. Příkladem je tkáňový endoglin nebo VCAM-1, tedy molekuly, které byly použity pro tuto diplomovou práci.

Nejprve byly pozorovány změny exprese předem vybraných markerů endotelové dysfunkce u myši, kterým byla podávána standardní a vysokotuková dieta. Stěžejním cílem pak bylo zhodnotit, zda je tento model vhodný pro další studium endotelové dysfunkce na výzkumné skupině doc. Nachtigala.

Endoglin (CD 105) je receptorem typu III pro některé členy TGF- β nadrodiny proteinů. Endoglin hraje pravděpodobně významnou roli v hematopoéze, angiogenezi, vývoji kardiovaskulárního systému a regulaci cévního tonu [52]. Exprese tohoto homodimerního transmembránového glykoproteinu byla již prokázána v cévách postižených aterosklerózou, především v endotelových buňkách a buňkách hladké svaloviny. Dá se tedy předpokládat účast endoglinu na aterogenezi. Byly identifikovány dvě izoformy endoglinu. Predominantní L-izoforma a minoritní S-izomorfa [24]. L-endoglin má angiogenní účinky, kdežto S-endoglin má účinky antiangiogenní. Studiemi bylo prokázáno, že zvyšující se S-izoforma ve stárnoucích endotelových buňkách přispívá ke kardiovaskulárním onemocněním [25, 26].

V této diplomové práci byly použity myši, kterým byla podávána vysokotuková dieta s obsahem 1,25 % cholesterolu a 40 % tuku po dobu 3 měsíců. Poté byl v preparátech stanovován endoglin. Již dříve bylo prokázáno, že u myši kmene C57BL/6J krmených vysokotukovou dietou po dobu 3 měsíců vede ke snížení hladiny HDL cholesterolu a výraznému zvýšení cholesterolů VLDL, IDL a LDL [28].

S přihlédnutím k těmto studiím jsme tedy předpokládali vyšší expresi endoglinu na endotelu aorty u experimentální skupiny.

Tato teorie se ale nepotvrdila a exprese endoglinu byla u obou skupin srovnatelná.

VCAM-1 je endotelová adhezní molekula, která patří do skupiny imunoglobulinů [49]. Tato adhezní molekula hraje dominantní roli v iniciaci aterosklerózy. VCAM-1 není běžně za fyziologických podmínek exprimována, ale v případě působení zánětlivých cytokinů na endotel dochází k expresi VCAM-1 [22]. Dále může VCAM-1 posílit adhezi leukocytů na cévní endotel a podílet se na jejich diapedezi [15]. U této adhezní molekuly byla prokázána stimulace již u časných fází aterosklerotických lézí [18]. Je tedy možné uvažovat o VCAM-1 jako o citlivém markeru.

Tyto studie ukazují, že při použití diety s vysokým obsahem tuků můžeme předpokládat silnou expresi VCAM-1.

Získané výsledky však silnější expresi VCAM-1 u experimentální skupiny neukázaly. Naopak se silnější exprese adhezní molekuly mohla jevit u kontrolní skupiny myší.

Výsledky exprese endoglinu a VCAM-1 u použitého modelu myší tedy nevykazovaly téměř žádné rozdíly. Je možné se domnívat, že podávání vysokotukové diety po dobu 3 měsíců nemělo významný vliv na rozvoj endotelové dysfunkce. Tento experimentální model pro požadovanou studii by tedy mohl být označen za nevhodný a pro další studie je potřeba jej upravit či nahradit modelem jiným.

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce byla detekce exprese dvou markerů endotelové dysfunkce v aortě myši. Markery endoglin a VCAM-1 byly stanovovány za pomoci imunohistochemie u dvou skupin myši kmene C57BL/6J. Myši byly rozděleny do dvou skupin, kdy první skupina byla kontrolní a myším byla podávána standardní strava. Druhá skupina myši pak přijímala vysokotukovou dietu s obsahem 1,25 % cholesterolu a 40 % tuku po dobu 3 měsíců.

U zkoumaného markeru endoglinu použita imunohistochemická metoda prokázala velmi silnou expresi, a to na cévním endotelu. Nebyly ovšem pozorovány rozdíly exprese z hlediska intenzity a lokalizace mezi kontrolní a experimentální skupinou.

U zkoumaného markeru VCAM-1 byla opět prokázána exprese u obou skupin myši pomocí imunohistochemie. Exprese se jevila silnější u kontrolní skupiny. VCAM-1 byla také pozorována pouze na cévním endotelu.

Výsledky této práce ukazují, že použitý model myši, krmený touto dietou v tomto určitém časovém úseku nemá signifikantní vliv na rozvoj dysfunkce endotelu z pohledu morfologického nálezu.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ

ABC metoda	avidin-biotin komplex metoda
ALK-1	active receptor like kinasa-1
ALK-5	active receptor like kinasa-5
ApoB	apolipoprotein B
ApoE	apolipoprotein E
DAB	diamobenzín
eNOS	endotelová syntáza oxidu dusnatého
ET-1	endotelin-1
HDL	vysokodenzitní lipoprotein
IDL	intermediální lipoprotein
ICAM-1	intracelulární adhezní molekula-1
IL-1	interleukin-1
IL-1b	interleukin 1b
LDL	nízkodenzitní lipoprotein
LDLr ^{-/-}	LDL receptor deficitní
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NO	oxid dusnatý
PAI-1	plasminogen activator inhibitor
PBS	phosphate-buffered saline
PGI ₂	prostacyklin
SABC	streptavidin-biotin komplex
TGF- β	transformující růstový faktor beta

TNF	tumor nekrotizující faktor
TXA2	tromboxan 2
t-PA	tkáňový aktivátor plasminogenu
VCAM-1	vaskulární adhezní molekula 1
VLDL	velmi nízkodenzitní lipoprotein
ZP	zona pellucida

SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1	Schématické znázornění stavby cévy
Obrázek 2	Graficky znázorněný rozdíl mezi jednotlivými vrstvami arterií a vén
Obrázek 3	Endotelová buňka
Obrázek 4	Prostup leukocytů skrz endotel za pomoci adhezních molekul
Obrázek 5	Schématické znázornění stavby adhezní molekuly VCAM-1
Obrázek 6	Schéma znázorňující předpokládané role endoglinu
Obrázek 7	Znázornění přímé metody imunohistochemie
Obrázek 8	Znázornění nepřímé metody imunohistochemie
Obrázek 9	Grafické znázornění principu barvení metodou ImmPress™
Obrázek 10	Schématické znázornění barvení technikou EnVision®
Obrázek 11	Schématické znázornění barvení Avidin-Biotin Complex metodou
Obrázek 12, 13	exprese endoglinu, (kontrolní skupina)
Obrázek 14, 15	exprese endoglinu, (kontrolní skupina)
Obrázek 16, 17	exprese endoglinu, (kontrolní skupina)
Obrázek 18, 19	exprese endoglinu, (experimentální skupina)
Obrázek 20, 21	exprese endoglinu, (experimentální skupina)
Obrázek 22, 23	exprese endoglinu, (experimentální skupina)
Obrázek 24, 25	exprese VCAM-1 (kontrolní skupina)
Obrázek 26, 27	exprese VCAM-1 (kontrolní skupina)
Obrázek 28, 29	exprese VCAM-1 (kontrolní skupina)
Obrázek 30, 31	exprese VCAM-1 (experimentální skupina)
Obrázek 32, 33	exprese VCAM-1 (experimentální skupina)

Obrázek 34, 35 exprese VCAM-1 (experimentální skupina)

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. BALKO, J., TONAR, Z. a VARGA, I. *Memorix histologie*. 2. vydání. Praha: Triton, 2017, s. 200-204. ISBN 978-80-7553-249-7
2. ŠTEJFA, M. *Kardiologie*. 3., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2007, s52-53, 289. ISBN 978-80-247-1385-4
3. Cévy. *WikiSkripta* [online]. 2008- [cit. 2017-03-16]. ISSN 18046517. Dostupné z: <http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Cévy&oldid=319091>
4. KONRÁDOVÁ, V. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany: H, 2000, s 115-123. ISBN 80-860-2280-3
5. B42 MIKROCIRKULACE. In: *Masarykova univerzita: Lékařská fakulta* [online]. Brno, 2008 [cit. 2017-03-16]. Dostupné z: fyziologie_otazka_B42-B46.doc - med.muni
6. KARÁSEK, D. a VAVERKOVÁ, H. 2004. Endoteliální dysfunkce, možnosti její detekce a využití v klinické praxi. *Interní medicína pro praxi* [online]. s. 450–453. Dostupné z: www.internimedicina.cz
7. ČIHÁK, R. *Anatomie 3*. 2. vydání. Praha: Grada, 2004, s. 25-37. ISBN 978-80-247-1132-4.
8. *Body Systems Project: Circulatory System* [online]. New York [cit. 2017-03-21]. Dostupné z: <https://grbodysystems.wordpress.com/>
9. GERHARDT, H. a BETSHOLTZ., CH. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell and Tissue Research* [online]. 2003-10-1, **314**(1), 15-23. ISSN 0302-766x. Dostupné z: DOI: 10.1007/s00441-003-0745-x
10. TREMOLI, E., JAFFE E. A., GOLDMAN, K. T. a WEKSLER, B. B. Prostacyclin production by endothelial cells. Effects of sera from normal and hyperlipidemic subjects. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. 1985, **5**(2). ISSN 1079-5642. Dostupné z: DOI: 10.1161/01.ATV.5.2.178

11. Prostacyclin system. *ACTELION* [online]. Switzerland, 1997 [cit. 2017-03-22].
Dostupné z: <https://www1.actelion.com/en/scientists/mechanisms-of-action/prostacyclin-receptor-agonism/prostacyclin-system.page>
12. MASOPUST, J. *Vybrané kapitoly z patobiochemie orgánů*. Praha: Karolinum, 1997, s. 75. ISBN 80-718-4415-2
13. Fyziologie endotelu, dysfunkce endotelu. *Tvorba a ověření e-learningového prostředí pro integraci výuky preklinických a klinických předmětů na LF a FZV UP Olomouc* [online]. Olomouc, 2010 [cit. 2017-03-22]. Dostupné z: <http://pfyziol.fup.upol.cz/castwiki2/?p=1456>
14. CYBULSKY, M. I., LICHTMAN, A. H., HAJRA, L. a IYAMA, K. Leukocyte adhesion molecules in atherogenesis. *Clinica Chimica Acta* [online]. 1999, **286**(1-2), 207-218. ISSN 00098981. Dostupné z: DOI: 10.1016/S0009-8981(99)00102-3
15. Adhezní molekuly. *Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi: SEKK* [online]. Pardubice, 2015 [cit. 2017-03-14]. Dostupné z: <http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/B/ZPAAL.htm>
16. BAIULA, M., BEDINI, A., CARBONARI, G., DATTOLI, S. D. a SPAMPINATO, S. Therapeutic Targeting of Eosinophil Adhesion and Accumulation in Allergic Conjunctivitis. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2012, **3**. ISSN 1663-9812. Dostupné z: DOI: 10.3389/fphar.2012.00203
17. PAZOS, M. D. C. a NADER, H. B. Effect of photodynamic therapy on the extracellular matrix and associated components. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* [online]. 2007, **40**(8), 1025-1035. ISSN 1414-431x. Dostupné z: DOI: 10.1590/S0100-879X2006005000142
18. CYBULSKY, M. I., IYAMA, K., LI, H. et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 2001-5-15, **107**(10), 1255-1262. ISSN 0021-9738. Dostupné z: DOI: 10.1172/JCI11871
19. PEPINSKY, B., HESSION, C., CHEN, L., et al. Structure/Function Studies on Vascular Cell Adhesion Molecule- 1. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. Massachusetts, 1992, **267**(25), 17820-17826

20. BARTHEL, S. R., JOHANSSON, M. W., MCNAMEE, D. M. a MOSHER., D. F. Roles of integrin activation in eosinophil function and the eosinophilic inflammation of asthma. *Journal of Leukocyte Biology* [online]. 2007, **83**(1). ISSN 0741-5400. Dostupné z: DOI: 10.1189/jlb.0607344
21. LEY, K. a HUO, Y. VCAM-1 is critical in atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 2001-5-15, **107**(10), 1209-1210. ISSN 0021-9738. Dostupné z: DOI: 10.1172/JCI13005
22. COOK-MILLS, J. M. a HUO, Y. VCAM-1 signals during lymphocyte migration. *Molecular Immunology* [online]. 2002, **39**(9), 1209-1210. ISSN 01615890. Dostupné z: DOI: 10.1016/S0161-5890(02)00206-7
23. FONSATTI, E., NICOLAY, H. J. M., ALTOMONTE, M., COVRE, A. a MAIO, M. Targeting cancer vasculature via endoglin/CD105: a novel antibody-based diagnostic and therapeutic strategy in solid tumours. *Cardiovascular Research* [online]. 2010, 86(1). ISSN 0008-6363. Dostupné z: DOI: 10.1093/cvr/cvp332
24. NACHTIGAL, P., ZEMANKOVA, L. V., RATHOUSKA, J. a STRASKY, Z. The role of endoglin in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. [online]. 2012, 224(1), 4-11. Dostupné z: DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.03.001
25. JERKIC, M. a LETARTE, M. *Increased endothelial cell permeability in endoglin-deficient cells* [online]. *The FASEB Journal* [online]. 2015, 29(9), 3678-3688. ISSN 0892-6638. Dostupné z: DOI: 10.1096/fj.14-269258
26. POSPÍŠILOVÁ, N. *Adhezní molekuly a jejich úloha v modelových patologických stavech*. Hradec Králové, 2009, s. 26-27. Disertační práce. Vedoucí práce Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, PhD
27. DAUGHERTY, A. Mouse Models of Atherosclerosis [online]. Dostupné z: DOI: 10.1097/00000441-200201000-00002
28. BRESLOW, J. L. Mouse Models of Atherosclerosis [online]. Dostupné z: DOI: 10.1126/science.272.5262.685.

29. WILLIAMS, K. J., FEIG, J. E. a FISHER, E. A. Rapid regression of atherosclerosis: insights from the clinical and experimental literature. [online]. 2008, 5(2) 91-102. ISSN 1743-4297. Dostupné z: DOI: 10.1038/ncpcardio1086
30. JAWIEŃ, J., NASTAŁEK, P. a KORBUT, R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *Journal of Physiology and Pharmacology* [online]. 2004, **55**(3), 503-517
31. MEYRELLES, S. S, PEOTTA, V. A., PEREIRA, T. M. a VASQUEZ, E. C. Endothelial Dysfunction in the Apolipoprotein E-deficient Mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. *Lipids in Health and Disease* [online]. 2011, **10**(1), 211. ISSN 1476-511x. Dostupné z: DOI: 10.1186/1476-511X-10-211
32. NAKASHIMA, Y., PLUMP, A. S., RAINES, E. W., BRESLOW, J. L. a ROSS, R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. [online]. 1994, 14, 133-140. Dostupné z: DOI: 10.1161/01.ATV.14.1.133.
33. ISHIBASHI, S., BROWN, M. S., GOLDSTEIN J. L., GERARD, R. D., HAMMER, R. E. a HERZ, J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *The Journal of Clinical Investigation* [online]. 1993, 92(2), 883-893. Dostupné z: DOI: 10.1172/JCI116663
34. WITTING, P. K., PETTERSON, K., ÖSTLUND-LINDQVIST, A. M., WESTERLUND, CH., ERIKSSON, A. W. a STOCKER, R. Inhibition by a coantioxidant of aortic lipoprotein lipid peroxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor gene double knockout mice. *The FASEB Journal* [online]. 1999, 13(6), 667-675
35. TOUSOULIS, D., KAMPOLI, A., PAPAGEORGIOU, C. T. N. a STEFANADIS, CH. The Role of Nitric Oxide on Endothelial Function. *Current Vascular Pharmacology* [online]. 2012, 10(1), 4-18. ISSN 1570-1611. Dostupné z: DOI: 10.2174/157016112798829760.
36. MAŇÁKOVÁ, E. a SEICHERTOVÁ A. *Metody v histologii*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2001, s.11-14. ISBN 80-246-0230-X..

37. BARTŮŇKOVÁ, J. a PAULÍK, M. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2011, s. 76-80. ISBN 978-80-247-3533-7
38. ŠKODOVÁ, S. *Sledování exprese vybraných markerů funkce endotelu u myši s vysokými hladinami solubilního endoglinu*. Hradec Králové, 2015, s. 31-35. Diplomová práce. Vedoucí práce Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, PhD
39. TONAR, Z. Základní typy imunohistochemických metod. In: *Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze* [online]. Plzeň, 2002 [cit. 2017-03-10].
- Dostupné z: <https://www.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/ihc/node8.html>
40. ImmPRESS Anti-Rat Ig (peroxidase) Polymer Detection Kit. *ASIA BIOSIENCE* [online]. Taiwan, 2007 [cit. 2017-03-27]. Dostupné z: http://www.abscience.com.tw/chinese/03product/01product_content.php?pid=4&tid=756&id=25637
41. ImmPRESS™ Polymer Detection Systems & Reagents. In: *VECTOR Laboratories* [online]. United Kingdom, 2002 [cit. 2017-03-27]. Dostupné z: <https://vectorlabs.com/products/immunohistochemistry/immpress-polymer-reagents>
42. EnVision Detection Systems, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse. *Agilent Technologies* [online]. United States, 1999 [cit. 2017-03-27]. Dostupné z: <http://www.agilent.com/en/products/immunohistochemistry/visualization-systems/envision-systems/envision-detection-systemsperoxidase-dab-rabbit-mouse>
43. SABATTINI, E., BISGAARD, K., ASCANI, S. et al. The EnVision system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMate, CSA, LABC, and SABC techniques. *Journal of Clinical Pathology* [online]. 1998, 51(7), 506-511. Dostupné z: DOI: 10.1136/jcp.51.7.506. ISSN 0021-9746
44. Avidin-Biotin Complex (ABC) Methods. *LabCE* [online]. Lawrenceville, USA, 2001 [cit. 2017-03-12].
- Dostupné z: https://www.labce.com/spg538343_avidin_biotin_complex_abc_methods.aspx

45. Kapiláry se souvislou endotelovou výstelkou. *Masarykova univerzita: lékařská fakulta* [online]. Brno, 2008 [cit. 2017-04-18].
Dostupné z: http://www.med.muni.cz/histology/MedAtlas_2/MA_txt1-2-1-1.htm
46. O'BRIEN, K. D., ALLEN, M. D., MCDONALD, T. O. et al. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 1993, 92(2), 945-951. ISSN 0021-9738. Dostupné z: DOI: 10.1172/JCI116670.
47. BOSHOFF, CH. a WEISS, R. Aids-related malignancies. *Nature Reviews Cancer* [online]. 2002, 2(5), 373-382. ISSN 14741768. Dostupné z: DOI: 10.1038/nrc797.
48. Direct vs indirect immunofluorescence. In: *Abcam* [online]. Cambridge, UK, 1998 [cit. 2017-04-20]. Dostupné z: <http://www.abcam.com/secondary-antibodies/direct-vs-indirect-immunofluorescence>
49. BLANKENBERG, S., BARBAUX, S. a TIRET, L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* [online]. 2003, 170(2), 191-203. ISSN 00219150. Dostupné z: DOI: 10.1016/S0021-9150(03)00097-2.
50. POTTEAUX, S., AIT-OUFELLA, H. a MALLAT, Z. Mouse Models for Atherosclerosis. *Drug Discovery Today: Disease Models: Cardiovascular Diseases* [online]. 2008, 4(4), 165-170. Dostupné z: DOI: 10.1016/j.ddmod.2007.11.005.
51. LIPMAN, N. S., JACKSON, L. R., TRUDEL, L. J. a WEIS-GARCIA, F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR Journal* [online]. 2005, 46(3), 258-268
52. SINGH, R. B., MENGI, S. A., XU, Y-J., ARNEJA, A. S. a DHALLA, N. S. Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process. *Experimental & Clinical Cardiology. Experimental an Clinical Cardiology*. [online]. 2002, 7(1), 40-53.

53. LOPEZ-NOVOA, J. M. a BERNABEU, C. The physiological role of endoglin in the cardiovascular systém. *American Journal of Physiology* [online]. 2010, 299(4), 959-974. Dostupné z: DOI: 10.1152/ajpheart.01251.2009
54. HWANG, S. J., BALLANTYNE, C. M., SHARRETT, A. R., SMITH, L. C., DAVIS, C. E., GOTTO, A. M. a BOERWINKLE, E. Circulating Adhesion Molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in Carotid Atherosclerosis and Incident Coronary Heart Disease Cases: The Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) Study. *Circulation* [online]. 1997, 96(12), 4219-4225. ISSN 0009-7322. Dostupné z: DOI: 10.1161/01.CIR.96.12.4219
55. Avidin-Biotin Complex Method for IHC Detection. *ThermoFisher SCIENTIFIC* [online]. USA, 2016 [cit. 2017-05-01].

Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/avidin-biotin-complex-method-ihc-detection.html>